

JÚNIOR RÉGIS BATISTA CYSNE

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *MORINGA OLEIFERA* L.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Francisco A. P. Campos

FORTALEZA
2006

JÚNIOR RÉGIS BATISTA CYSNE

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *MORINGA OLEIFERA* L.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Agronomia.

Aprovada ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Francisco A. P. Campos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dr. Osmundo Brilhante de Oliveira Neto
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Josefa Diva Nogueira Diniz
Universidade Federal do Ceará – UFC

A Deus, por ter me ajudado em todos os momentos da minha vida;
A meus pais Francisco Guilaro Ramos Nogueira e Maria Luzineti
Batista Nogueira, por todo carinho e incentivo para comigo;
A minha esposa Valdilene Rufino do Nascimento por todo amor e carinho;
A meus avos, Luiz Batista Filho (*in memorian*) e
Rita Batista Costa, dos quais nunca me faltou apoio;
Aos meus amigos sempre presentes: Ciro, Carlos Eduardo, Josemir e Olienaide.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ajudar muito nos momentos difíceis, me dando força para superar as dificuldades do curso, e por iluminar meus caminhos;

A Universidade Federal do Ceará, em especial aos Departamentos de Fitotecnia e de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio;

Ao professor Francisco A. P. Campos pela orientação e ensinamentos;

A professora Josefa Diva Nogueira Diniz por todos os conselhos e ensinamentos;

Ao professor Osmundo Brilhante de Oliveira Neto por todos os conselhos;

Aos professores, Francisco Távora, Fanuel Pereira, Renato Inecco, Joaquim Enéas, Ervino Bleicher e Sebastião Medeiros;

Aos meus amigos do curso de mestrado, Abdul Razak, Ciro de Miranda Pinto, João Paulo Soares e Josemir de Souza Gonçalves, pela amizade e companheirismo;

Alguns experimentos aqui mostrados, foram feitos graças a recursos obtidos do projeto **“Moringa oleifera: Uma Fonte Alternativa de Proteínas como Aditivo em Reação em Substituição ao Milho e/ou Soja no Setor Produtivo Avícola** – Projeto n. 503426/2003-2, Edital CT-Agro/MCT/MESA), coordenado pelo Prof. José Tadeu Abreu de Oliveira, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, a quem agradecemos.

Ao pessoal do laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Abdul, Camila, Cintia, Emanuel, Eduardo, Fábio, Fabiola, João Paulo, Juliana Brasil, Juliana Vaez e Tiago;

Aos meus familiares que contribuíram para o meu sucesso nesta especialização;

RESUMO

A moringa, *Moringa oleifera* L., é uma árvore da família Moringaceae, destacando-se pelo uso intensivo das propriedades químicas de suas sementes. O presente trabalho objetivou estabelecer um protocolo básico para a micropropagação da moringa. Os ápices caulinares utilizados na micropropagação foram retirados de plântulas germinadas *in vitro* cultivadas em meio MS. Ápices caulinares de plantas adultas também foram isolados e cultivados em meio WPM. A desinfestação das sementes e dos ápices caulinares de plantas adultas foi realizada com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) sendo que a 0,25 % por 10 minutos, proporcionou os melhores resultados para o estabelecimento das culturas. Os ápices caulinares, excisados de plantas cultivadas em meio MS após, 12 dias da germinação, foram submetidos a diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 0,05; 0,25; 1,25 e 6,25 μM). No meio com 1,25 μM de BAP verificou-se uma taxa de multiplicação de 8,9. A fim de maximizar a regeneração de plantas *in vitro*, foram realizados experimentos para avaliar as concentrações de BAP e de ácido indol-3-butírico (AIB) no meio de cultivo com diferentes concentrações e combinações. A melhor taxa de regeneração e alongamento de brotações foi obtida com o meio MS contendo 0,25 μM de BAP e 0,25 μM de AIB. Contudo após o subcultivo neste mesmo meio, observou-se uma redução na taxa de multiplicação de 8,95 para 5,08. Para os ápices provindos de plantas adultas foi realizado um ensaio testando-se diferentes meios de cultura. O meio com os sais WPM promoveu um melhor estabelecimento para os ápices, visto que os mesmos se apresentavam menos vitrificados se comparados aos demais meios. Definido o meio WPM realizou-se um ensaio com diferentes combinações de BAP (0,0; 0,05; 0,25; 1,25 e 6,25 μM). O meio com 6,25 μM promoveu a formação de calo seguida da formação de brotações. Estas foram subcultivadas em meio contendo 0,25 μM de BAP onde se desenvolveram sem a formação de brotações laterais.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*, micropropagação, *in vitro*

ABSTRACT

Moringa Moringa oleifera Lam is a tree plant belonging to the family Moringaceae widely used for the chemical properties its seeds. In this work, we attempted to develop a basic protocol for the micropropagation of the plant. Shoot apexes originating from *in vitro* germinated seedlings on Murashige and Skoog (MS) medium were used as primary explants. Adventitious shoots obtained from field growing trees were also isolated and inoculated on Wood Plant Medium (WPM) for the same purpose. Subjecting the seeds to various regimes and sequences of surface sterilization using sodium hypochlorite (NaOCl) showed that the best regime is the use of 0.25% NaOCl for 10 minutes. In an attempt to micropropagate *Moringa*, excised adventitious shoots were cultured on MS medium for 12 days, following which they were transferred to MS medium supplemented with varying concentrations (0.0,0.05,1.25 and 6.25uM) of 6-Benzylaminopurine (BAP). Explants subjected to the medium containing 1.25uM BAP demonstrated the highest rate of multiplication of 89%. In order to optimize the regeneration of plants from the primary explants, they were subjected to combinations of BAP and Indol-3-butyric acid at various concentrations. Although the highest rate of regeneration and shoot elongation was obtained when equimolar concentrations of BAP and IBA of 0.25uM was supplemented in an MS medium, there was a sharp decrease in the rate of multiplication from 89.5% to 50.8% when the shoots were sub cultured onto the same medium after 28 days. Subjecting shoot apexes obtained from field growing plants to WPM and MS based medium formulations, it was discovered that WPM promoted better proliferation of the explant compared to all other medium. Using WPM supplemented with different concentrations of BAP (0.0,0.05,0.25,1.25), the medium containing 6.25uM BAP was found to result in formation of callus followed by shoot formation. Transferring the proliferating shoots to a medium containing 0.25uM BAP led to their development without formation of adventitious shoots.

Keywords: Moringaceae, shoot, explants

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 — Aspecto visual de uma planta de *Moringa oleifera* L. A) planta adulta; B) vagens; C) flores; D) e E) sementes..... 4
- FIGURA 2 — Germinação de sementes (A) e ápices caulinares (B) de *Moringa oleifera* L., aos 7 dias de cultivo *in vitro* em meio MS, desinfestadas com 0,25% de NaOCl por 10 minutos..... 28
- FIGURA 3 — Número médio de gemas (nós + ápices) de *Moringa oleifera* L., emitidos a partir de ápices caulinares com diferentes concentrações de BAP μM em cada subcultivo de 28 dias *in vitro*..... 31
- FIGURA 4 — Altura média das plantas de *Moringa oleifera* L., a partir de ápices caulinares com diferentes concentrações de BAP μM em cada subcultivo de 28 dias *in vitro*..... 32
- FIGURA 5 — Número médio de gemas (nós + ápice) a partir de ápices caulinares de moringa inoculados sob diferentes combinações dos reguladores de crescimento BAP e AIB (μM)..... 35
- FIGURA 6 — Altura média de plântulas (cm) a partir de ápices caulinares de moringa inoculados sob diferentes combinações dos reguladores de crescimento BAP e AIB (μM)..... 36
- FIGURA 7 — Altura média de plântulas (cm) e número médio de gemas a partir do subcultivo de gemas de moringa inoculadas sob diferentes combinações dos reguladores de crescimento BAP e AIB (μM)..... 41
- FIGURA 8 — Altura média das plântulas (cm) aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de AIB dentro das concentrações de 0,0 (A), 0,05 (B), 0,25 (C) e 1,25 μM (D) de BAP..... 42

- FIGURA 9 — Número médio de gemas aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de AIB dentro das concentrações de 0,0 (A), 0,05 (B), 0,25 (C) e 1,25 μM (D) de BAP..... 43
- FIGURA 10 — Fonte, tipo e desenvolvimento de explantes na micropropagação de *Moringa oleifera* L. A) plântula de semente germinada em meio MS suplementado com 0,25 μM de BAP; B) ápice caulinar utilizado como fonte de explante; C) nós utilizados como fonte de explante; D) plântula proveniente do subcultivo em meio MS suplementado com 0,25 μM de AIB..... 44
- FIGURA 11 — Plântulas de moringa aos 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 1,25 μM de BAP. A) plântula em senescência em meio sem AgNO_3 ; B) plântula inoculada em meio com 3mg/L de AgNO_3 47
- FIGURA 12 — Micropropagação de ápices caulinares retirados de plantas adultas de *Moringa oleifera* L. A) ápice desinfestado; B) ápice caulinar aos 14 dias de cultivo em meio WPM com 0,25 μM de BAP; C) formação de calos em meio WPM com 6,25 μM de BAP; D) parte aérea subcultivada em meio WPM com 0,25 μM de BAP após 14 dias de inoculação..... 57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 —	Planta e partes da planta de <i>Moringa oleifera</i> L. A) planta adulta; B) vagens; C) flores; D) sementes com casca e E) sementes sem casca.....	15
TABELA 2 —	Análise de variância para altura de plântulas, percentagem de germinação e de contaminação, de sementes de <i>Moringa oleifera</i> L., germinadas <i>in vitro</i> e desinfestadas com diferentes concentrações de solução de NaOCl (0,125; 0,25; 0,5 e 1%) aos 7 dias de cultivo <i>in vitro</i> .	26
TABELA 3 —	Porcentagem de contaminação, altura média (cm) e percentagem de germinação de sementes de <i>Moringa oleifera</i> L., desinfestadas com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) aos 7 dias de cultivo <i>in vitro</i>	27
TABELA 4 —	Resumo da análise de variância para altura média das plantas e para o número médio de gemas emitidas por ápices caulinares de moringa, aos 28 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS sob diferentes concentrações de BAP e de AIB.....	35
TABELA 5 —	Percentagens de ápices caulinares que emitiam brotações e raízes aos 28 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS com BAP e AIB.....	38
TABELA 6 —	Resumo das análises de variância para ápices caulinares de moringa, para os parâmetros altura de plântulas e número de gemas, quando cultivados em meio MS sob diferentes concentrações de BAP e de AIB	41
TABELA 7 —	Percentagem de plântulas em senescência após 40 dias de inoculação em meio MS suplementado com 1,25 μ M de BAP e diferentes concentrações de Nitrato de Prata (AgNO_3), a partir de ápices caulinares de moringa provindos de sementes.....	47

TABELA 8 —	Resumo da análise de variância para os parâmetros altura de plântulas, percentagem de sobrevivência e de contaminação, para ápices caulinares de plantas adultas de moringa, quando desinfestadas com diferentes concentrações de solução de NaOCl.....	50
TABELA 9 —	Altura média de plântulas e percentagem de contaminação de ápices caulinares de moringa provenientes de plantas adultas aos 7 dias de cultivo <i>in vitro</i> após assepsia com diferentes concentrações de NaOCl...	51
TABELA 10 —	Resumo da análise de variância para os parâmetros altura de plântulas e número de gemas em ápices caulinares de plantas adultas de moringa aos 28 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes tipos de meio.....	54
TABELA 11	Altura média de plântulas e percentagem de contaminação de ápices caulinares de moringa provenientes de plantas adultas aos 7 dias após assepsia com diferentes concentrações de NaOCl.....	55
TABELA 12 —	Valores médios do número e comprimento (cm) de brotos de moringa em função de diferentes concentrações de BAP aos 21 dias de cultivo <i>in vitro</i>	57

SUMÁRIO

RESUMO	17
ABSTRACT	18
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Considerações gerais sobre a <i>Moringa oleifera</i> L.....	14
2.2 Origem da <i>Moringa oleifera</i> L.	14
2.3 Relação Filotaxonômica da <i>Moringa oleifera</i> L.....	15
2.4 Descrição botânica da <i>Moringa oleifera</i> L.	15
2.7 Germinação <i>in vitro</i>	20
2.8 Micropropagação	21
2.9 Meios de Cultura	23
2.10 Reguladores de Crescimento	28
2.11 Plantas Lenhosas x Micropropagação	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Local e material utilizado	31
3.2 Micropropagação da <i>Moringa oleifera</i> L. a partir de gemas obtidas de sementes germinadas <i>in vitro</i>	31
3.2.1 Experimento 1: Desinfestação e germinação (estabelecimento <i>in vitro</i>)	31
3.2.2 Experimento 2: Efeito do BAP na multiplicação de ápices caulinares de <i>Moringa oleifera</i> L., obtidos de sementes germinadas <i>in vitro</i> em dois subcultivos	32
3.2.3 Experimento 3: Influência do BAP e do AIB no estabelecimento de plântulas de <i>Moringa oleifera</i> L., a partir de ápices caulinares de plantas germinadas <i>in vitro</i>	33
3.2.4 Experimento 4: Subcultivo de gemas (ápices + nós) de <i>Moringa oleifera</i> L. em meio MS com diferentes concentrações de BAP e de AIB.	33
3.3 Micropropagação de <i>Moringa oleifera</i> L., a partir de ápices caulinares retirados de plantas adultas	34
3.3.1 Experimento 1: Desinfestação de explantes provenientes de plantas adultas	34

3.3.2 Experimento 2: Efeito dos diferentes tipos de meio de cultura para o desenvolvimento <i>in vitro</i> de ápices caulinares obtidos de plantas adultas de <i>Moringa oleifera</i> L.	35
3.3.3 Experimento 3: Efeito do BAP no estabelecimento de ápices caulinares de <i>Moringa oleifera</i> L., provindos de plantas adultas.	35
3.4 Análise estatística	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Micropropagação de <i>Moringa oleifera</i> L. a partir de gemas obtidas de sementes germinadas <i>in vitro</i>	37
4.1.1 Experimento 1. Desinfestação e germinação (estabelecimento <i>in vitro</i>).....	37
4.1.2 Experimento 2: Efeito do BAP na multiplicação de ápices caulinares de <i>Moringa oleifera</i> L., obtidos de sementes germinadas <i>in vitro</i> , em dois subcultivos.	42
4.1.3 Experimento 3: Influência do BAP e do AIB no estabelecimento de plântulas de <i>Moringa oleifera</i> L., a partir de ápices caulinares de plantas germinadas <i>in vitro</i>	46
4.1.4 Experimento 4: Subcultivo de gemas (ápices + nós) de <i>Moringa oleifera</i> L. em meio MS com diferentes concentrações de BAP e de AIB.	52
4.1.5 Experimento 5: Efeito do Nitrato de Prata (AgNO ₃) no controle da senescência de plântulas micropropagadas de <i>Moringa oleifera</i> L.....	59
4.2 Micropropagação de <i>Moringa oleifera</i> L., a partir de ápices caulinares retirados de plantas adultas.	62
4.2.1 Experimento 1: Desinfestação de explantes provenientes de plantas adultas	62
4.2.2 Experimento 2: Efeito dos diferentes tipos de meio de cultura para o desenvolvimento <i>in vitro</i> de ápices caulinares obtidos de plantas adultas de <i>Moringa oleifera</i> L.	65
4.2.3 Experimento 3: Efeito do BAP no estabelecimento <i>in vitro</i> de ápices caulinares obtidos de plantas adultas de <i>Moringa oleifera</i> L.	69
5 CONCLUSÕES.....	72
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

A moringa, *Moringa oleifera* L., é uma planta tropical pertencente à família *Moringaceae*, nativa da Índia que foi introduzida no Brasil por volta de 1950. É encontrada na região Nordeste, principalmente nos Estados do Maranhão, Piauí e Ceará. Pode ser explorada, tanto em condições irrigadas como de sequeiro, apresentando um grande potencial em face de sua multiplicidade de usos (Lorenzi e Matos, 2002).

É uma planta que serve a muitos propósitos, e a maioria de suas partes são úteis para várias aplicações, sendo referida como ‘árvore milagrosa’ (Fuglie, 1999). As vagens, folhas e flores são importantes fontes de alimentos em algumas áreas da Índia e da África. As folhas são especialmente, ricas em vitaminas, minerais e proteínas constituindo assim um alimento de grande valor nutricional (Freiberger *et al.*, 1998). As raízes e outras partes da planta são utilizadas na medicina tradicional. Das sementes é extraído o óleo que pode ser usado na preparação de alimentos, na lubrificação de máquinas e na indústria de cosméticos.

As sementes desta planta e de outras espécies do mesmo gênero apresentam uma propriedade a qual é a mais explorada atualmente: a coagulação de matéria em suspensão. Esta propriedade das sementes proporcionará que o cultivo da moringa possa se tornar viável até mesmo para o mercado internacional. Pois a busca por soluções simples, de baixo custo e mais compatíveis ambientalmente no tratamento de águas residuárias se faz necessária. Uma alternativa para o pós-tratamento de efluentes é o uso da semente da *Moringa oleifera* L. como coagulante natural.

Mundialmente, poucos trabalhos são conhecidos sobre o melhoramento genético da *Moringa oleifera*, inclusive sobre o cultivo *in vitro*. Na literatura consultada, somente foi encontrado um trabalho sobre micropropagação do gênero *Moringa*, sendo este utilizado também para outras espécies do mesmo gênero. Neste trabalho o protocolo de regeneração apresentou problemas devido à senescência das culturas *in vitro*.

Neste aspecto, este trabalho teve o objetivo de estabelecer uma metodologia eficiente de micropropagação *in vitro* para produção de mudas em larga escala de *Moringa oleifera* L., para formação de plantios comerciais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre a *Moringa oleifera* L.

A família Moringaceae é bastante conhecida e estudada, particularmente pelo fato de algumas de suas espécies apresentarem propriedades floculantes ou coagulantes, sendo utilizadas em diversos países como um método natural, eficiente e econômico de purificação de água (Gassenschmidt *et al.*, 1995). Muitas espécies desta família caracterizam-se, também, por sua resistência a pragas e doenças, facilidade de cultivo e rapidez no crescimento.

Segundo Verdcourt (1985), a *Moringa oleifera* é uma árvore nativa do norte da Índia e é agora cultivada amplamente ao longo dos trópicos. É às vezes conhecida como “baqueta” por causa do formato da sua vagem e “rábano (rabanete) picante” descrevendo o gosto de suas raízes. A moringa cresce rapidamente da semente ou enxertos, mesmo em solos pobres. Não necessita muito cuidado e sobrevive a longos períodos de seca. Cresce rapidamente até quatro metros de altura, produzindo flores e frutos dentro de um ano de plantio.

2.2 Origem da *Moringa oleifera* L.

A *Moringa oleifera* é conhecida como “drumstick” ou “bastão de tambor” devido ao formato de seus frutos. Pertence à família Moringaceae, que é composta por apenas um gênero (*Moringa*), sendo este constituído por quatorze espécies arbóreas e arbustivas (Okuda *et al.*, 2001).

Dentre as espécies do gênero *Moringa*, sobressai a *Moringa oleifera*, devido às suas mais diversas utilizações. Trata-se de uma planta perene, amplamente distribuída nos países da Ásia e da África, em especial, na Índia, Egito, Filipinas, Tailândia, Malásia, Paquistão, Singapura, Jamaica e Nigéria (Ramachandran *et al.*, 1980; Bezerra *et al.*, 2004). Esta espécie pode, ainda, ser encontrada nas Américas Central, do Norte e do Sul (Anwar e Bhangar, 2003). No Brasil, onde foi introduzida por volta de 1950, é encontrada na região Nordeste, principalmente nos Estados do Maranhão, Piauí e Ceará.

2.3 Relação Filotaxonômica da *Moringa oleifera* L.

A *Moringa oleifera* é classificada taxonomicamente conforme descrito a seguir:

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Dilleniidae

Ordem: Capparidales

Família: Moringaceae

Gênero: *Moringa*

Espécie: *Moringa oleifera* L.

2.4 Descrição botânica da *Moringa oleifera* L.

Segundo Silva e Kerr (1999), é uma árvore de grande porte. Na América tropical, onde foi introduzida como planta ornamental, é uma planta de porte arbóreo, de tronco único, (Figura 1), com folhas compostas, bipinadas, com sete folíolos pequenos em cada pina.

A espécie *Moringa oleifera* é uma árvore perene que apresenta um tronco único de pequeno porte, sendo bem menor no Brasil do que na Índia (Lorenzi e Matos, 2002), possuindo caule delgado (até 10 cm), muitas vezes único, e copa aberta, em forma de sombrinha. O seu crescimento é bastante rápido (1,5 cm por dia), podendo a planta atingir cerca de 12 m de altura, desenvolvendo-se bem em regiões quentes, semi-áridas e úmidas e em terras arenosas ou argilosas bem drenadas (Cáceres *et al.*, 1991).

Na casca da *Moringa oleifera* é verificada a presença de látex. Na medula central há uma grande quantidade de mucilagem, rica em arabinose, galactose e ácido glucurônico. As folhas são verde pálidas, decíduas alternadas, pecioladas e compostas, podendo, ou não, apresentar estipula, mucilagem epidérmica, estômatos ou pelos. Os folíolos laterais possuem formas elípticas enquanto que os terminais são ligeiramente maiores que os laterais. O mesófilo contém cristais de cálcio (Cáceres *et al.*, 1991).

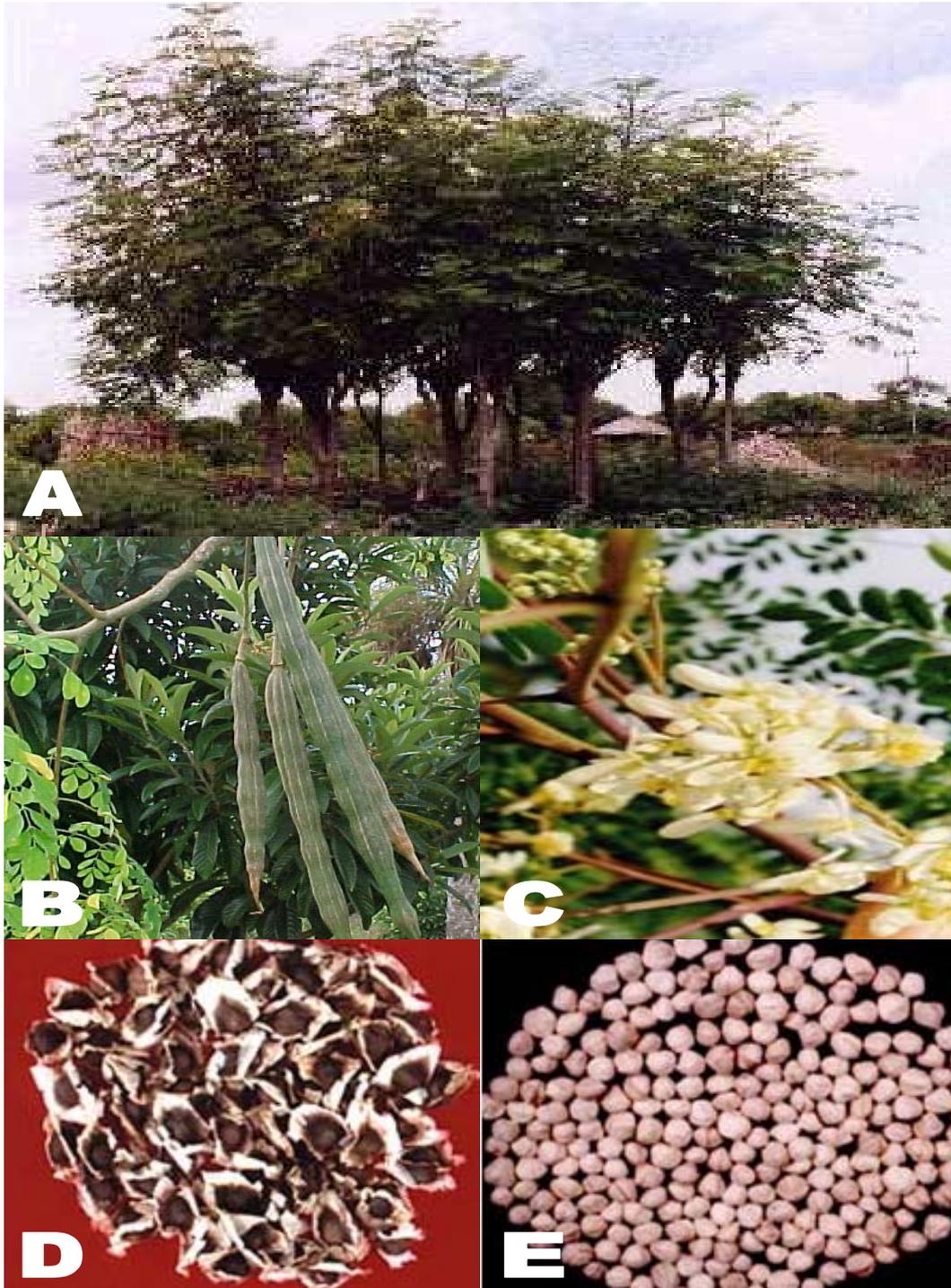


FIGURA 1 — Planta e partes da planta de *Moringa oleifera* L. A) planta adulta; B) vagens; C) flores; D) sementes com casca e E) sementes sem casca.

Fonte: (<http://www.todaba.com.br/licenciamento/Moringa/index>).

As flores são diclamídeas, ou seja, o perianto dividiu-se em cálice e corola. São ainda monoclinas, perfumadas, de cores creme ou branca, estando agrupadas em inflorescências terminais do tipo cimosa, as chamadas panículas. Em lugares onde o índice pluviométrico é maior do que 600 mm por ano, as árvores estão sempre floridas; caso contrário, a planta só se reproduz na estação chuvosa. O androceu apresenta estaminóides e estames. O gineceu é sincárpico, tricarpelar, gamocarpelar, uniloculado, pluriovulado, com ovário súpero, e apresenta placentação parietal. Os frutos são vagens pendulares, possuem uma cor verde a marrom esverdeado, formato triangular e se quebra longitudinalmente em três partes quando seco, sendo deiscente, é uma cápsula, tem aproximadamente 30 a 120 cm de comprimento e 1,8 cm de espessura (Cáceres *et al.*, 1992).

As vagens contêm de 10 a 20 sementes armazenadas em uma polpa branca. As sementes globóides, são escuras por fora e contêm no seu interior uma massa branca e oleosa. O núcleo é encoberto por uma concha sendo trivalvas, oleaginosas, e medindo até 1 cm de diâmetro (Lorenzi e Matos, 2002).

A raiz assemelha-se na aparência e no sabor ao rábano. A casca da raiz é espessa, mole e reticulada, de cor pardo-clara, externamente, e branca, internamente, lenho mole, poroso e amarelado. Tem odor pungente e sabor semelhante ao do rábano (Cáceres *et al.*, 1992).

No nordeste brasileiro, inclusive no Ceará, onde é cultivada como planta ornamental e medicinal, é conhecida como lírio-branco, quiabo de quina ou simplesmente moringa (Matos, 1998).

2.5 Utilização da *Moringa oleifera* L.

Segundo Dahot (1998), quase todas as partes da planta são consumidas. É conhecida como um tipo de amendoim em Malawi. Em outros lugares do mundo as árvores da moringa são apreciadas pelos camponeses pela qualidade de suas vagens e folhas. As folhas têm um alto conteúdo de proteína (27%) e são ricas em vitamina A e C, cálcio, ferro e fósforo, podendo ser usadas na alimentação humana ou animal. Uma vantagem é que as folhas da moringa podem ser colhidas durante a estação seca.

A cultura da moringa é de grande importância comercial em toda a Índia. No sul, muitas variedades foram desenvolvidas com diferentes comprimentos de vagem e períodos de crescimento. As vagens são vendidas nos mercados locais. Vagens verdes são cortadas em

seções e enlatadas em salmoura para exportação para a Europa e Estados Unidos (Jahn *et al.*, 1986).

O óleo contido nas sementes tem alto valor alimentício e industrial. É conhecido como 'Ben Oil' sendo claro, doce, inodoro e resistente a rancificação; por conseguinte é comestível e útil na fabricação de cosméticos. As sementes da moringa contêm 38% de seu peso em óleo que é constituído de glicerídeos dos ácidos oléico (63,4%), linoleico (3,1%), palmítico (8,3%) e esteárico (8,0%) (Dahot, 1988). Testes laboratoriais em Leicester confirmaram que o que resta das sementes após a extração do óleo, contém ainda coagulantes ativos. Estes restos podem ser usados para o tratamento de água sendo obtidos sem nenhum custo como subproduto da extração do óleo (Eilert *et al.*, 1981).

Um ponto importante é que as sementes da moringa podem primeiro ser usadas para a extração de óleo, sem reduzir a eficácia no tratamento da água. O óleo da moringa é de alta qualidade e potencialmente tem alto valor no mercado. Tem valor, tanto para a cozinha como para ingrediente principal na produção de sabão. A demanda por óleo no Malawi é muito maior do que a produção atual dentro do país, necessitando da importação do óleo de soja da América do Sul (Eilert *et al.*, 1981).

De acordo com Jahn *et al.*, (1986), as sementes possuem polissacarídeos com forte poder aglutinante, o que permite o uso das sementes pulverizadas no tratamento da água por floculação e sedimentação, capaz de eliminar a turvação, micro-partículas, fungos, bactérias e vírus. Contém um princípio dotado de atividade antimicrobiana, a pterigospermina, bem como os glicosídeos moringina, 4-(α -L-ramnosilori)-isotiocianato de benzila e 4-(α -L-ramnosilori)-fenil-acetonitrila. Estes componentes antimicrobianos agem principalmente contra *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei*, *Serratia marcescens* e ainda, sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* e *Streptococcus*, o que justifica seu emprego na preparação de pomada antibiótica.

O uso de sementes trituradas de moringa para purificação da água a um custo de uma pequena fração do tratamento químico convencional, é uma tentativa da mais alta importância. Isto possibilitaria a substituição de agentes coagulantes usados atualmente (sulfato de alumínio, por exemplo), muitas vezes prejudiciais à saúde humana e animal. Num projeto piloto para tratamento de água em Malawi, na África, foi constatado que, enquanto o alumínio é eficiente como coagulante em uma faixa restrita de pH da água, as sementes de moringa atuam independentemente do pH, constituindo numa vantagem adicional em regiões mais pobres, onde normalmente não é possível controlar efetivamente o pH antes da coagulação (Okuda *et al.*, 2001).

Segundo Folkard *et al.* (1993), para a purificação da água, coloca-se o pó da semente sobre a superfície da água na proporção de 0,2 g/litro, mistura-se bem e, após um dia, a água estará pronta para uso doméstico. Este tipo de tratamento da água pode ser muito útil no controle dos surtos diarreicos, inclusive da cólera, especialmente nas áreas onde outras medidas sanitárias são dificilmente aplicáveis.

2.6 Cultura de Tecidos

A grande diversidade de produtos de origem vegetal faz desses uma fonte importante e ainda pouco explorada de recursos naturais. Estima-se que somente 5 a 15% das 250.000 a 500.000 espécies de plantas superiores têm sido objeto de estudos quanto a sua composição química e atividade biológica dos seus produtos metabólicos (Spjut, 1985).

Nesse contexto, a cultura de tecidos se destaca como uma importante ferramenta de estudos dessas espécies. De maneira simplificada, pode-se dizer que este ramo da biotecnologia é um conjunto de técnicas em que pequenos fragmentos de tecido vivo (explantes) são isolados de um organismo e cultivados assepticamente, por períodos indeterminados, em um meio nutritivo semidefinido ou definido e incubado em condições ambientais controladas. Para o caso de tecidos vegetais, esta definição original deve ser ampliada, de modo a incluir toda uma gama de explantes que vai desde plântulas e órgãos a células isoladas e protoplastos (Mroginski e Roca, 1993; Torres e Caldas, 1990). Por meio desta técnica, praticamente qualquer espécie vegetal pode ser regenerada *in vitro*, utilizando-se vários processos (Dixon, 1985; Tisserat, 1985).

Os principais usos da cultura de tecidos são a reprodução de plantas *in vitro* para produção de mudas, a recuperação de plantas isentas de vírus (limpeza clonal), a conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas (conservação de germoplasma), a obtenção de mutantes *in vitro*, a produção de haplóides e duplos haplóides e a produção de plantas transgênicas (Torres *et al.*, 1998).

Durante os últimos anos esta técnica tornou-se de grande interesse, uma vez que diversas espécies encontram-se em vias de extinção (Costa, 1995; Pereira *et al.*, 2005).

2.7 Germinação *in vitro*

A germinação é um fenômeno biológico que pode ser considerado botanicamente como a retomada do crescimento do embrião, com o conseqüente rompimento do tegumento pela radícula (Labouriau, 1983). Germinação pode também ser definida como o início do desenvolvimento de um novo indivíduo vegetal a partir de uma semente colocada sob condições favoráveis (Larousse, 1998), dando origem a uma plântula normal (Popinigis, 1985).

Para os tecnólogos de sementes, o processo é reconhecido desde que a plântula apresente tamanho suficiente para que possam avaliar a normalidade de suas partes e sua possibilidade de sobrevivência (Labouriau, 1983). Já para Borges e Rena (1993), para que ocorra a retomada do crescimento das estruturas essenciais do embrião (germinação), a semente deve estar madura, ser bem constituída, conservar o poder germinativo, e ao mesmo tempo, deve receber, do meio exterior, água e oxigênio em quantidade suficiente para assegurar um intenso metabolismo.

Basicamente, a germinação é composta por três fases: embebição (quando acontece à reativação do metabolismo), indução de crescimento e protusão da radícula. A embebição é um conjunto de processos físicos que ocorrem em função das propriedades dos colóides e sua dimensão varia com a permeabilidade do tegumento, composição química da semente, da área de contato entre a semente e a água, com a pressão hidrostática e o estado fisiológico da própria semente (Bewley e Black, 1994).

Para que a germinação ocorra, a semente precisa estar com os mecanismos internos (físico, fisiológico e bioquímico) e com as condições externas (água, oxigênio, temperatura e luz) apropriadas. Segundo Mayer e Poljakoff-Mayer (1989), o processo de germinação é controlado por fatores intrínsecos e extrínsecos, os quais podem ser representados pela composição química da semente, seu balanço hormonal e fatores ambientais.

Segundo Popinigis, (1985), temperatura, disponibilidade de água e luz são fatores ambientais que influenciam consideravelmente no processo de germinação, e a quantidade desses fatores, varia de acordo com as espécies e cultivares. Conforme Carvalho e Nakagawa (1988), quando a temperatura é elevada, ocorre maior absorção de água, afetando significativamente a germinação. Por outro lado, Evenari *et al.*, (1987) considera o elemento luz, essencial ao processo, visto ser este um indicador de classificação das espécies

(fotoblásticas positivas e negativas). Sendo assim, Gomes (1999) afirma que condições ambientais apropriadas para o processo de germinação podem ser obtidas em laboratórios por meio da multiplicação *in vitro*.

A germinação de sementes *in vitro* tem sido utilizada para a obtenção de plântulas assépticas como fonte de explantes, dentre outras aplicações. Outra grande vantagem do uso de sementes é a obtenção de explantes jovens favorecendo a multiplicação e formação de calos para o cultivo em meios nutritivos contendo reguladores de crescimento (Grattapaglia e Machado, 1998).

2.8 Micropropagação

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e de maior impacto (Grattapaglia e Machado, 1998). É uma técnica desenvolvida há mais de 30 anos e tem sido amplamente usada em nível comercial, por laboratórios, com finalidades de multiplicação em larga escala de clones selecionados, em menor espaço de tempo e a preços competitivos (Torres *et al.*, 1998). Compreende um conjunto de técnicas, nas quais, um explante, que pode ser constituído de uma célula, um tecido ou um órgão, é isolado e cultivado em condições assépticas sobre um meio nutritivo artificial.

Baseado no fenômeno da totipotência das células somáticas vegetais, qualquer célula vegetal viva possui suficiente informação genética para produzir uma planta normal, desde que lhe sejam propiciadas condições nutricionais e ambientais adequadas. A cultura de tecidos, desta forma propicia a regeneração de uma planta a partir de fragmentos de outra (Torres *et al.*, 1998).

A micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro*, é uma das aplicações de mais larga utilização na cultura de tecidos. Destina-se, principalmente, a aquelas espécies de difícil propagação. É uma importante estratégia para o melhoramento, clonagem e multiplicação de plantas em larga escala e para obtenção de plantas livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e genética (Villalobos e Thorpe, 1991). França (2003) cita a regeneração *in vitro* por meio da cultura de brotos, como uma ferramenta especialmente vantajosa para obtenção de clones que mantenham todas as características da planta mãe a qual permite a preservação de genótipos produtores de compostos medicinais.

Além do controle efetivo de doenças, apresenta também facilidade no manuseio e transporte, independência da sazonalidade e utilização de pequenas porções da planta para produção em larga escala comercial. Tal fato pode ser exemplificado pela micropropagação obtida a partir de um segmento nodal de *Rosmarinus officinalis* L. var. *Genuína*, onde se obtêm 5.000 plantas no período de um ano (Chatuverdi *et al.*, 1984).

As células e os tecidos vegetais estão determinados para rotas morfogênicas e metabólicas específicas, de modo que, por um processo ordenado, formam órgãos e regeneram uma planta (Henshaw *et al.*, 1982). No entanto, esta predisposição para morfogênese, depende da própria natureza do tecido, do tratamento recebido e do seu estado vegetativo, podendo haver formação de novos fenótipos, que vão permanecer, mesmo cessando os fatores que determinam a mudança. Os estudos mostram que quando expomos células totipotentes a certas condições experimentais, se desenvolvem tipos específicos de organogênese que excluem a outros, variando as células cultivadas em sua competência para a morfogênese e a sensibilidade a indutores (Torres e Caldas, 1990).

A propagação vegetativa é essencial para a manutenção dos caracteres agronômicos desejáveis do genótipo, essencialmente se forem de origem clonal (McGranahan *et al.*, 1987).

Murashige e Skoog (1974) apresentaram um esquema padrão, representando os estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*.

Este processo de formação de plantas via organogênese, constitui-se do estabelecimento *in vitro* por meio da seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas; a multiplicação dos propágulos mediante sucessivos subcultivos em meio próprio para multiplicação; partes aéreas produzidas, para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo (Torres e Caldas, 1990).

Atualmente, a maior importância da atividade da micropropagação está na obtenção de plantas livres de vírus, para a produção de mudas de lenhosas, herbáceas e arbustivas. Para os sistemas de certificação de mudas, principalmente frutíferas, a limpeza clonal e a micropropagação são indispensáveis (Santos, 2003).

Para obtenção de plantas com limpeza clonal, utilizam-se principalmente, ápices caulinares para propagação de plantas isentas de vírus. Uma das vantagens deste sistema é a manutenção da identidade do genótipo (planta) regenerado, que ocorre na maioria dos casos em virtude das células do meristema do ápice caulinar serem mais estáveis geneticamente (Santos, 2003). Além disso, o ápice é uma estrutura organizada, que pode se desenvolver em

parte aérea num meio de cultura adequado, sem passar pela fase de calo, o que pode levar à alterações genéticas. De modo geral, a micropropagação das espécies lenhosas é mais difícil quando comparada à das espécies herbáceas, devido à perda da capacidade morfogênética de seus tecidos (Torres e Caldas, 1990).

A micropropagação tem sido aplicada para multiplicar e propagar numerosas plantas lenhosas nos últimos anos. Historicamente, a aplicação comercial desta tecnologia era restrita às espécies herbáceas. No entanto, nas últimas duas décadas, tem-se obtido considerável sucesso na obtenção de espécies florestais. Economicamente, estas espécies são extremamente importantes na obtenção de produtos e subprodutos da madeira, além dos projetos de reflorestamento, muito discutidos recentemente (Harry e Thorpe, 1994).

As espécies lenhosas de interesse agrícola são basicamente constituídas pelas espécies frutícolas como maçã, pêra, pêsego, manga, citrus, etc., bem como pelas espécies florestais como o eucalipto, as coníferas, a teca, etc. Outras espécies como o café, cacau, chá mate e outros tipos de chás também se enquadram neste grupo de espécies, além das espécies produtoras de amêndoas como a castanha do Pará, o caju e a noz macadâmia (Hackett e Murray, 1993).

2.9 Meios de Cultura

Os meios de cultura, por constituírem parte essencial da cultura de tecidos, têm evoluído juntamente com a própria ciência da biotecnologia. Os meios fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em parte, o padrão do desenvolvimento (Caldas *et al.*, 1998). Estes, afirmam que as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas, são conservadas nas células cultivadas *in vitro*, embora alguns processos, como a fotossíntese, possam ser reduzidos pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células.

Desta forma, os meios nutritivos baseiam-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações, para atender às necessidades de cada espécie no cultivo *in vitro*. Vale ressaltar que, para cada situação (tipo de explante, espécie, cultivar e objetivo), o meio adequado e eficiente é variável Pasqual, (2001). Para se determinar qual o melhor meio para cada caso, deve-se recorrer a diversos ensaios.

O controle quase absoluto do crescimento e da morfogênese a partir de explantes *in vitro* é uma das principais características da cultura de tecidos vegetais. O crescimento e o

desenvolvimento *in vitro* de uma planta estão determinados por uma série de fatores complexos: constituição genética, presença de nutrientes (macro e micronutrientes e açúcar), fatores físicos que influenciam o crescimento (luz, temperatura, pH e concentrações de O₂ e CO₂) e, por fim, adição de algumas substâncias orgânicas (reguladores de crescimento, vitaminas, etc.) (Torres e Caldas, 1990).

Em relação à água e aos nutrientes minerais, uma planta não pode viver na ausência destes, *in vitro* ou *in vivo*. Já a adição de açúcar ao meio de cultivo, em alguns casos, é muito importante, já que as plantas (ou seus fragmentos) não são completamente autotróficas quando se desenvolvem nestas condições (Pierik, 1990).

Inicialmente, foram utilizados os mais diferentes tipos de meio e componentes, até o estabelecimento do meio 'MS' de Murashige e Skoog (1962). Este meio contém 40 mM de NO₃⁻ e 20 mM de NH₄⁺ e o crescimento das células e tecido das plantas está relacionado a alta concentração de amônia e nitrato. Usa-se também o meio básico WPM (Wood Plant Medium) de Loyd e McCown (1981), que foi desenvolvido para cultura de brotações de plantas lenhosas e apresenta 1/4 das concentrações de NO₃⁻ e NH₄⁺ do meio MS. Esta diferença é importante quando se procura um meio adequado para as diferentes espécies de plantas e tipos de cultura, pois o conteúdo total de N₂ no meio constitui fator determinante para o crescimento e morfogênese (George, 1996).

Há também o meio básico B5 que além de mais potássio, têm um alto nível de íons sulfato, e foi desenvolvido por Gamborg *et al.*, (1968), apresenta níveis elevados de NO₃⁻ e K⁺ e baixos de NH₄⁺, em concentrações superiores a 2 mM de NH₄⁺.

O meio de cultura deve suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes necessários ao crescimento. Basicamente, o meio de cultura fornece não só macro e micronutrientes, mas também carboidratos (normalmente a sacarose) para substituir o carbono que a planta fixa na atmosfera pela fotossíntese. Para proporcionar melhor desenvolvimento, normalmente incluem-se certos componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento. Diversos outros produtos, a exemplo de suco de fruta, leite de coco, extratos de leveduras e proteínas hidrolisadas, são usados. Como é importante que o meio seja o mesmo todas as vezes que for preparado, componentes que podem variar em sua composição devem ser evitados, mesmo que proporcionem resultados positivos (Pasqual *et al.*, 1997).

Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese dos compostos orgânicos necessários para o crescimento das células além de atuarem como um componente osmótico do meio de cultura (Torres e Caldas, 1990).

Murashige e Skoog (1974) afirmam que vários carboidratos têm sido usados, mas não têm mostrado superioridade sobre a sacarose, que suporta as mais altas taxas de crescimento da maioria das espécies. Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos sobre a entrada e o metabolismo da sacarose *in vitro*. Alguns autores relatam que a sacarose é hidrolisada em glicose e frutose gradualmente no meio, pela ação da enzima invertase localizada na parede celular (Kozai, 1991). A atividade biológica de qualquer substância não somente varia com a dosagem, mas depende do meio no qual é colocada (Murashige e Skoog, 1962).

Portanto, a concentração de sacarose é um fator importante para obter crescimento satisfatório, dependendo do meio e do explante. A concentração mais utilizada é a de 3% (p/v). Observou-se um aumento na taxa de fotossíntese quando, em subcultivos sucessivos, a concentração de sacarose foi reduzida de 20 ou 40 g/L para 10 g/L. A concentração de sacarose afeta a assimilação de nutrientes e o efeito de reguladores de crescimento. Além disso, a concentração de sacarose afeta a produção de metabólitos secundários, de grande importância nos processos metabólicos e na composição da parede celular (Grattapaglia e Machado, 1998).

Em *Moringa oleifera* L., quando foram comparados o meio MS e o meio básico WPM em relação à qualidade da parte aérea, notou-se que o meio com 50% dos sais do meio MS mostrou ser mais eficiente no número de partes aéreas produzidas do que os meios WPM, SH e B5. (Stephenson e Jed., 2004).

Em *Tournefortia cf. paniculata*, quando foram comparados o meio WPM e o meio básico MS em relação ao tamanho das brotações, houve um incremento de 30% neste parâmetro para o meio WPM. (Bertolucci, 1999).

Kumar *et al.*, (1998) estudando o efeito de diferentes meios de cultura em *Ficus carica*, observaram que o meio MS mostrou ser mais eficiente na multiplicação e indução de raízes, quando comparado com o meio B5.

Diversos meios foram desenvolvidos para o cultivo *in vitro* de plantas herbáceas e lenhosas como o de Murashige e Skoog (1962). Especificamente em plantas lenhosas, já foram testados mais de 60 tipos diferentes de meios básicos de cultura. Isto é, devido a grande diversidade de espécies lenhosas e seus mais diversos comportamentos e balanços nutricionais. (Thorpe e Harry, 1991).

O meio básico de cultura mais utilizado é o meio MS (Bonga e Durzan, 1987). No entanto, em 1980, Lloyd e McCown mostraram que tecidos de espécies lenhosas se desenvolviam melhor em meio de cultura com baixa concentração de sal. Como o meio básico

MS possui as mais altas concentrações de sais em relação às outras formulações, acharam melhor reduzi-los pela metade, (Rao e Lee, 1986).

A composição dos meios de cultivo B5 (Gamborg *et al.*, 1968), MS (Murashige e Skoog, 1962) e WPM (Lloyd e McCown, 1980) são mostradas na TABELA 1 (Caldas *et al.*, 1998; Melo *et al.*, 1999).

TABELA 1 – Composição dos Meios B5 (Gamborg *et al.*, 1968), MS (Murashige e Skoog, 1962), WPM (Lloyd e McCown, 1980).

Componentes	B5	MS	WPM
	mg/L (mM)	mg/L (mM)	mg/L (mM)
Macronutrientes			
CaCl ₂ . 2H ₂ O	150 (1,02)	440 (2,29)	96 (0,05)
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	-	-	556 (2,35)
KH ₂ PO ₄	-	170 (1,25)	170 (1,25)
KNO ₃	2500 (24,7)	1900 (18,8)	-
K ₂ SO ₄	-	-	990 (5,69)
MgSO ₄ . 7H ₂ O	250 (1,01)	370 (1,5)	370 (1,5)
NH ₄ NO ₃	-	1650 (20,6)	400 (4,9)
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	150 (1,05)	-	-
Micronutrientes			
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025 (0,0001)	0,025 (0,0001)	-
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025 (0,0001)	0,025 (0,0001)	0,25 (0,001)
H ₃ BO ₃	3 (0,048)	6,2 (0,1)	6,2 (0,1)
KI	0,75 (0,0045)	0,83 (0,005)	-
MnSO ₄ . H ₂ O	-	-	22,3 (0,13)
MnSO ₄ . 4H ₂ O	5,3 (0,031)	22,3 (0,13)	-
MoO ₃	-	0,01 (0,000007)	-
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,25 (0,001)	0,25 (0,01)	0,25 (0,01)
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2 (0,007)	8,6 (0,029)	8,6 (0,029)
FeEDTA			
Fe(SO ₄) . 7H ₂ O	27,8 (0,1)	27,8 (0,1)	27,8 (0,1)
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	37,3 (0,1)	37,3 (0,1)	37,3 (0,1)
Mistura orgânica			
Ácido nicotínico	1,0 (0,008)	0,5 (0,004)	0,5 (0,004)
Mio-inositol	100 (0,55)	100 (0,55)	100 (0,55)
Piridoxina . HCL	1,0 (0,0049)	0,5 (0,0024)	0,5 (0,0024)
Glicina	-	2,0 (0,0266)	2,0 (0,0266)
Tiamina . HCL	10 (0,030)	0,1 (0,0003)	0,1 (0,0003)

Fonte: Caldas *et al.*, 1998; Melo *et al.*, 1999.

2.10 Reguladores de Crescimento

Segundo Pierik (1990), no cultivo *in vitro* de plantas superiores, os reguladores de crescimento, especialmente auxinas e citocininas, apresentam papel muito importante. Pode-se dizer que o cultivo *in vitro* é praticamente impossível sem reguladores. São adicionados ao meio e têm a função de suprir as possíveis deficiências endógenas de hormônios nos explantes, estimulando respostas no crescimento, alongamento e multiplicação (Grattapaglia e Machado, 1998).

Os fitohormônios são compostos orgânicos sintetizados em uma parte da planta e translocados para outra, na qual, em pequenas concentrações, causam resposta fisiológica, que pode ser de promoção ou inibição dos processos de crescimento e diferenciação (Tombolato e Costa, 1998).

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que, quando aplicadas nas plantas, apresentam propriedades químicas semelhantes à dos hormônios. Os mais utilizados no estabelecimento e multiplicação *in vitro* são as auxinas ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolacético (AIA), e as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e tiadizuron (TDZ) (Caldas *et al.*, 1998).

As auxinas e citocininas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento (Skoog e Miller, 1957).

Outra classe de reguladores de crescimento, as giberelinas, geralmente são utilizadas para induzir alongamento das brotações durante a multiplicação, ou antes, do enraizamento. O principal representante desta classe é o ácido giberélico (GA₃). Quando o GA₃ é adicionado ao meio de cultura, freqüentemente, produz efeitos similares aos das auxinas (Pasqual, 2001).

2.11 Plantas Lenhosas x Micropropagação

A micropropagação de espécies lenhosas vem sendo estudada há várias décadas e tem como objetivo básico o estabelecimento de uma metodologia de multiplicação clonal de indivíduos superiores (Gomes, 1987).

Os tipos de cultivo *in vitro* utilizados para a propagação de plantas lenhosas não diferem muito dos utilizados para outras espécies de plantas. A fonte de explante deve ser cuidadosamente selecionada, uma vez que o tipo de explante muitas vezes determina o grau de sucesso na micropropagação. Explantes juvenis provenientes de sementes e partes juvenis de plantas adultas são os preferidos, embora tecidos maduros de folhas e flores sejam igualmente utilizados. Os explantes devem ser retirados de plantas em crescimento ativo e que não estejam passando por qualquer tipo de estresse como seca, temperaturas excessivamente baixas ou altas, deficiência mineral e ataque de pragas ou doenças (Santiago, 2003).

De acordo com Dunstan e Thorpe (1986), até que os aspectos bioquímicos e fisiológicos da juvenilidade e maturidade sejam esclarecidos, não serão possíveis elucidar alguns padrões morfogenéticos que são observados na cultura de tecidos em arbóreas.

Embora os explantes de espécies lenhosas tenham dificuldade de crescer e diferenciar *in vitro*, os primeiros cultivos foram utilizados experimentalmente com vários graus de sucesso em micropropagação de várias espécies arbóreas (Bonga e Durzan 1987).

Conforme Pierik (1990), quando a planta envelhece, sua capacidade regenerativa costuma diminuir, por isso tende-se a utilizar material procedente de plantas jovens, especialmente no caso de árvores e arbustos. Os tecidos embrionários, geralmente, têm alta capacidade regenerativa. O embrião e as sementes são utilizados, frequentemente, como material experimental para o cultivo de tecidos.

Os tecidos jovens, não lignificados, em geral são mais apropriados para o cultivo do que os tecidos velhos e lenhosos, contudo encontra-se um grande número de exceções na literatura (Pierik, 1990).

Plantações clonais de genótipos superiores com rendimentos acima da média poderão contribuir com significativo melhoramento na produção de madeira. Técnicas de micropropagação através de brotações axilares ou embriogênese somática estão começando a ser desenvolvidas para plantas lenhosas e, eventualmente, as técnicas poderão suprir os plantios clonais (Davey *et al.*, 1994).

As técnicas de cultura de tecidos são indicadas para determinadas espécies. Um exemplo seria o caso da multiplicação de plantas selecionadas por alta produtividade ou qualidade de frutos superiores. Outro caso no qual a multiplicação *in vitro* seria vantajosa, surge quando a espécie é rara, ou produz poucas sementes sendo assim a produção de mudas insuficiente para atender a demanda. Assim, a multiplicação por cultura de tecidos oferece a possibilidade de produzir dezenas ou centenas de mudas a partir de uma única semente ou matriz selecionada (Melo *et al.*, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e material utilizado

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza-CE, situada na Zona Litorânea, a 15,49 m de altitude, 3°43'02" de Latitude Sul e 38°32'35" de Longitude Oeste.

Para a multiplicação de *Moringa oleifera* L., foram utilizados explantes de plantas obtidas de sementes germinadas *in vitro* e de ápices caulinares coletados de plantas adultas localizadas no campo.

3.2 Micropropagação da *Moringa oleifera* L. a partir de gemas obtidas de sementes germinadas *in vitro*

3.2.1 Experimento 1: Desinfestação e germinação (estabelecimento *in vitro*)

Para o experimento de desinfestação, foram utilizadas sementes retiradas de vagens maduras, com coloração marrom, coletadas de plantas adultas localizadas no Campus do Pici da UFC, durante o ano de 2005. As sementes foram lavadas em água corrente, com detergente neutro a 5%, colocadas em recipiente de vidro contendo sílica gel e armazenadas em geladeira até sua utilização.

Após a remoção da casca, as sementes foram lavadas em água corrente, e em câmara de fluxo laminar, submetidas ao processo de desinfestação por imersão em álcool 70% (v/v) por 30 segundos e em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl): 0,125%; 0,25%; 0,5% e 1% (v/v), por 10 minutos.

Após a desinfestação, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada e esterilizada para a eliminação do excesso de hipoclorito, sendo em seguida inoculadas no meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) sem regulador de crescimento, acrescido 0,7% de agar, pH ajustado para 5,8 e autoclavado por 15 minutos a 121°C e 1 atm. Posteriormente, foram transferidas para sala de crescimento com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Usou-se um delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, 10 repetições e 3 frascos por repetição (5 sementes por frasco). Aos sete dias da inoculação, foram avaliadas as seguintes variáveis: **porcentagem de germinação:** representada pela porcentagem de sementes germinadas em cada tratamento e considerando-se germinadas, aquelas que tiveram capacidade de originar uma plântula normal; **contaminação por bactérias e fungos:** efetuando-se a contagem de sementes contaminadas; **comprimento da plântula:** o comprimento das plântulas foi mensurado com auxílio de uma régua, e os resultados expressos em centímetros.

3.2.2 Experimento 2: Efeito do BAP na multiplicação de ápices caulinares de *Moringa oleifera* L., obtidos de sementes germinadas *in vitro* em dois subcultivos

No primeiro subcultivo foram utilizados como explantes, ápices caulinares obtidos das plântulas provenientes de sementes germinadas *in vitro* em meio MS, desinfestadas com NaOCl 0,25% (v/v). Três dias após a germinação, os ápices caulinares com tamanho de aproximadamente 0,5 cm foram retirados e inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 ml de meio de cultura MS, acrescido de 3% de sacarose, 0,7% de agar e diferentes concentrações de BAP (0; 0,05; 0,25; 1,25; 6,25 μ M), pH ajustado para 5,8 e autoclavado por 15 minutos a 121°C e 1 atm. Posteriormente, foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, 10 repetições e três tubos por repetição (1 explante por tubo).

A altura das plântulas e o número de nós em cada explante foram avaliados aos 28 dias após a inoculação.

As gemas produzidas neste subcultivo foram utilizadas no segundo subcultivo utilizando-se o mesmo procedimento quanto ao preparo do meio de cultura, concentrações de BAP, condições ambientais, delineamento estatístico e avaliações do subcultivo anterior.

3.2.3 Experimento 3: Influência do BAP e do AIB no estabelecimento de plântulas de *Moringa oleifera* L., a partir de ápices caulinares de plantas germinadas *in vitro*

As sementes foram tratadas com álcool 70%, por 30 segundos e solução de NaOCl 0,25% (v/v), por 10 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada e esterilizada, e inoculadas no meio de cultura MS e transferidas para sala de crescimento a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Após 10 dias da inoculação, os ápices caulinares foram seccionados, e os explantes foram transferidos para o mesmo meio básico de cultura MS com diferentes combinações de reguladores de crescimento (BAP x AIB) visando à proliferação de brotos.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado num fatorial de 4x4, com quatro concentrações de BAP (0; 0,05; 0,25; 1,25 μM) e quatro concentrações de AIB (0; 0,01; 0,05; 0,25 μM) um total de 16 tratamentos, com 10 repetições por tratamento e três tubos por repetição (1 explante por tubo).

A avaliação quanto ao número de gemas por explante, altura dos explantes e presença de raízes foi realizada após 28 dias da inoculação.

3.2.4 Experimento 4: Subcultivo de gemas (ápices + nós) de *Moringa oleifera* L. em meio MS com diferentes concentrações de BAP e de AIB.

Foram utilizadas as gemas das plântulas produzidas no experimento 3 após 28 dias de inoculação os ápices e nós foram isolados de plântulas *in vitro* sob câmara de fluxo laminar asséptica, instalando-se o experimento nas mesmas condições de cultivo supracitadas em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x4, com quatro concentrações de BAP (0,0; 0,05; 0,25; 1,25 μM) e quatro concentrações de AIB (0; 0,01; 0,05; 0,25 μM) perfazendo um total de 16 tratamentos, com 6 repetições por tratamento e três tubos por repetição (1 explante por tubo).

A avaliação foi realizada em função dos tipos de explante utilizados (nó; ápice caulinar), número de nós por explante, altura dos explantes e presença de raízes. As avaliações foram realizadas no 28º dia após a inoculação.

3.2.5 Experimento 5: Efeito do Nitrato de Prata (AgNO_3) no controle da senescência de plântulas micropropagadas de *Moringa oleifera* L.

As sementes de moringa germinadas de acordo com a metodologia do experimento 1, produziram ápices caulinares e estes foram seccionados e inoculados em meio de cultura MS, acrescido de 3% de sacarose, 0,7% de agar, $1,25 \mu\text{M}$ de BAP, pH ajustado em 5,8 e nitrato de prata (AgNO_3) nas concentrações de 0; 3; 6; 9 mg/L.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, na presença de luz, a uma temperatura $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado, com 10 repetições, sendo cada uma, composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

A porcentagem de plântulas apresentando senescência foi avaliada aos 40 dias da inoculação.

3.3 Micropropagação de *Moringa oleifera* L., a partir de ápices caulinares retirados de plantas adultas

3.3.1 Experimento 1: Desinfestação de explantes provenientes de plantas adultas

Ápices caulinares com aproximadamente 1 cm, foram coletados de plantas adultas e imersos em álcool 70% (v/v) por 30 segundos e em solução de NaOCl por 10 minutos, nos seguintes tratamentos para a desinfestação (NaOCl 0,125%; 0,25%; 0,5% e 1% (v/v)).

Após a desinfestação, os ápices foram lavados por três vezes em água destilada e esterilizada e inoculados no meio de cultura MS com 3% de sacarose, $0,25 \mu\text{M}$ de BAP, $0,25 \mu\text{M}$ de AIB, 0,7% de agar, pH ajustado para 5,8 e autoclavado por 15 minutos a 121°C e 1 atm. Após a inoculação foram transferidos para sala de crescimento a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Usou-se um delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, com 5 repetições sendo um tubo por repetição (1 explante por tubo). A avaliação foi feita aos sete dias para as seguintes variáveis: **contaminação por bactérias e fungos:** foram efetuadas contagens do número de gemas contaminadas; **comprimento da plântula:** o comprimento

das plântulas foi mensurado com auxílio de uma régua, e os resultados expressos em centímetros.

3.3.2 Experimento 2: Efeito dos diferentes tipos de meio de cultura para o desenvolvimento *in vitro* de ápices caulinares obtidos de plantas adultas de *Moringa oleifera* L.

Ápices caulinares de aproximadamente 1 cm, contendo um meristema apical foram coletados de plantas adultas e inoculados em diferentes meios básicos de cultura. A desinfestação foi feita através de imersão em álcool 70% (v/v) por 30 segundos e em solução de hipoclorito de sódio a 0,25 % por 10 minutos.

Após a desinfestação, os ápices foram lavados por três vezes em água destilada e esterilizada e inoculados em diferentes meios de cultura: concentração dos sais (MS, MS/2, WPM, B5 e SH) com os reguladores de crescimento, BAP (0,25 μ M), IBA (0,25 μ M) acrescido 0,7% de agar, pH ajustado para 5,8 e autoclavado por 15 minutos a 121°C e 1 atm. Posteriormente, foram transferidos para sala de crescimento a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

No experimento usou-se um delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, 5 repetições sendo um tubo por repetição (1 explante por tubo). A avaliação foi realizada aos 28 dias observando-se as seguintes variáveis: **número de gemas:** foram efetuadas a contagem das gemas produzidas por cada explante; **comprimento da plântula:** o comprimento das plântulas foi mensurado com auxílio de uma régua, e os resultados expressos em centímetros.

3.3.3 Experimento 3: Efeito do BAP no estabelecimento de ápices caulinares de *Moringa oleifera* L., provindos de plantas adultas.

Foram utilizados, como fonte de explantes, ápices caulinares obtidos das plântulas provenientes de plantas adultas e inoculados em meio WPM, sendo o tratamento de 0,25 % de NaOCl o usado. Estes explantes foram inoculados em tubos de ensaio 25 x 150 mm contendo aproximadamente 10 ml de meio de cultura WPM, acrescido de 3% de sacarose, 0,7% de agar e diferentes concentrações de BAP (0; 0,05; 0,25; 1,25; 6,25 μ M), pH ajustado para 5,8 e

autoclavado por 15 minutos a 121°C e 1 atm. Posteriormente, foram transferidos para sala de crescimento a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Usou-se um delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, 6 repetições e três tubos por repetição (1 explante por tubo).

A altura das plântulas e o número de nós (gemmas) em cada explante foram avaliados aos 21 dias após a inoculação.

3.4 Análise estatística

Os dados foram inicialmente analisados quanto às pressuposições de normalidade, aditividade e homocedasticidade. Em seguida, por meio de análise de variância. Quando significativo pelo teste “F”, a comparação das médias foi efetuada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Como ferramenta de auxílio à análise estatística, foi utilizado o software StatView versão 5.0, do pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 1992-1998).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Micropropagação de *Moringa oleifera* L. a partir de gemas obtidas de sementes germinadas *in vitro*

4.1.1 Experimento 1. Desinfestação e germinação (estabelecimento *in vitro*)

Conforme a análise de variância apresentada na (TABELA 2), ocorreu efeito significativo entre os tratamentos utilizados na desinfestação com NaOCl para a altura das plântulas e para a porcentagem de germinação ($P < 0,05$). Para a porcentagem de contaminação das sementes, os tratamentos testados apresentaram diferenças significativas, com os resultados variando entre 0 e 10%.

Verificou-se que a partir da concentração de 0,25% de NaOCl não houve contaminação das sementes (TABELA 3). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Paiva Neto (1996), que obteve sucesso no controle da contaminação de segmentos nodais de moreira através da imersão em álcool 50% por 30 segundos e seguida em NaOCl 0,25% por 5 minutos.

Em segmentos nodais e apicais de mogno (*Swietenia macrophylla*) Lopes *et al.*, (2001), observaram o controle de fungos utilizando NaOCl à 1% e 2% por 15 minutos e álcool 70% por 2 minutos, enquanto que, Santos (1998), obteve desinfestação satisfatória em rizomas de *Smilax japecanga*, quando estes foram expostos por 30 minutos em água corrente e posteriormente, imersão em álcool 70% por 1 minuto e NaOCl 30% (0,75% de cloro ativo) por 10 minutos. Em estudos semelhantes com desinfestação de sementes de cajazeira, Souza *et al.*, (2000), e com umbu-cajazeira, Silva *et al.*, (2002), obtiveram as melhores respostas com o tempo de imersão por 5 minutos em NaOCl (1%) e por 10 minutos em bicloreto de mercúrio (0,02 %).

O controle da contaminação por patógenos que infestam explantes usados na cultura *in vitro* é de extrema importância devendo-se pesquisar e determinar protocolos mais eficientes levando em consideração o agente desinfestante, a espécie que se trabalha e o tipo de explante. Esta preocupação já foi mencionada por diversos pesquisadores relacionados à micropropagação, principalmente quando se trata de espécies lenhosas, sendo relatado por Texeira *et al.*, (1995).

No tratamento com 0,125% de NaOCl, a contaminação foi de 10% apresentando diferença dos demais tratamentos onde não houve contaminação. Neste tratamento verificou-se também uma menor porcentagem de germinação, devido a maior contaminação das sementes, embora não tenha apresentado diferença dos tratamentos com 0,5 e 1% de NaOCl.

Com 0,25% de NaOCl (FIGURA 2) não houve contaminação, verificando-se também uma maior porcentagem de germinação e altura das plantas, mostrando que essa concentração, além de ser suficiente para a desinfestação, permite o melhor desenvolvimento das plantas.

A redução do crescimento em altura e da germinação nas concentrações acima de 0,25% de NaOCl pode ser resultado de toxidez pelo NaOCl.

De posse destes dados, para a desinfestação das sementes de moringa, deve-se utilizar álcool etílico 70% em combinação com NaOCl (0,25 % de cloro ativo).

TABELA 2 – Análise de variância para altura de plântulas, percentagem de germinação e de contaminação, de sementes de *Moringa oleifera* L., germinadas *in vitro* e desinfestadas com diferentes concentrações de solução de NaOCl (0,125; 0,25; 0,5 e 1%) aos 7 dias de cultivo *in vitro*.

Causas de variação	G.L.	Quadrados médios		
		Altura (cm)	Germinação (%)	Contaminação (%)
NaOCl	3	55,537**	245,833*	350,00 ^{NS}
Resíduo	76	8,852	37,500	75,00
C.V. (%)		69,5	7,5	69,3

** significativo a 1% de probabilidade, * significativo a 5% de probabilidade, NS – não significativo.

TABELA 3 – Porcentagem de contaminação, altura média (cm) e porcentagem de germinação de sementes de *Moringa oleifera* L., desinfestadas com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) aos 7 dias de cultivo *in vitro*.

NaOCl (%)	Contaminação (%)	Altura (cm)	Germinação (%)
0,125	10 b	4,55 ab	65 b
0,25	0 a	6,42 a	90 a
0,5	0 a	3,72 b	85 ab
1	0 a	2,45 b	85 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.;

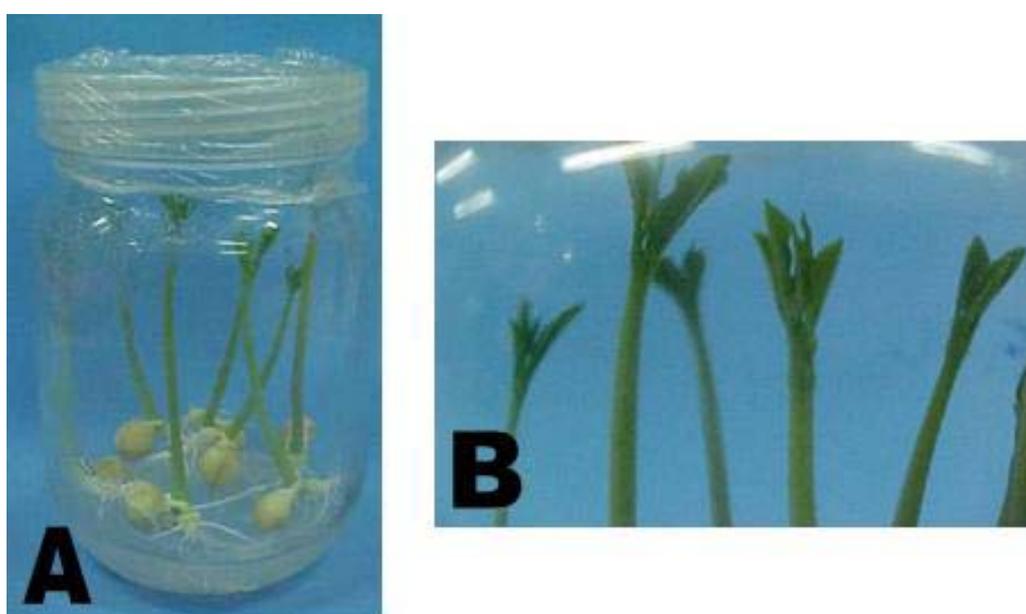


FIGURA 2 — Germinação de sementes (A) e ápices caulinares (B) de *Moringa oleifera* L., aos 7 dias de cultivo *in vitro* em meio MS, desinfestadas com 0,25% de NaOCl por 10 minutos.

4.1.2 Experimento 2: Efeito do BAP na multiplicação de ápices caulinares de *Moringa oleifera* L., obtidos de sementes germinadas *in vitro*, em dois subcultivos.

O número médio de gemas por explante e a altura média das plântulas de moringa são apresentados nas (FIGURAS 3 e 4). O tratamento com 1,25 μM de BAP apresentou maior crescimento em altura e maior número de gemas nos dois subcultivos.

No subcultivo 1, o número médio de gemas por explante foi de 8,9 no tratamento com 1,25 μM de BAP, apresentando diferença significativa dos tratamentos com 0,0; 0,05 e 0,25 μM que não apresentavam diferença entre si. A emissão de gemas observada no tratamento com BAP, está de acordo com a afirmação de Pinto *et al.*, (1994) que a emissão de gemas e brotações na ausência de BAP ocorre devido às citocininas inerentes ao próprio explante.

Para o subcultivo 2, o maior número médio de gemas também foi observado no tratamento com 1,25 μM de BAP (6,8 gemas por explante) com diferença significativa dos tratamentos com 0,05 e 0,25 μM de BAP que por sua vez apresentaram diferença do tratamento sem regulador, que apresentou menor número médio de gemas por explante. Estes resultados estão de acordo com Cheema e Sharma (1983), que relatavam que o BAP induz a uma alta taxa de proliferação.

A maior emissão de gemas no tratamento com 1,25 μM de BAP no subcultivo 1 deveu-se ao fato da formação de brotações laterais que ocorreram em 90% das plântulas. Já para o subcultivo 2 apenas 50% das plântulas apresentavam brotações laterais.

No subcultivo 1, o crescimento em altura dos explantes foi proporcional ao aumento da concentração até 0,25 μM com redução a partir daí, porém não houve diferença significativa do tratamento com 1,25 μM de BAP. No subcultivo 2 o maior crescimento em altura foi observado no tratamento com 1,25 μM de BAP apresentando diferença dos tratamentos com concentrações mais baixas.

No tratamento com 6,25 μM de BAP, ocorreu o menor crescimento com a formação de calo e partes aéreas incontáveis devido à perda da dominância apical. Estes resultados diferem dos observados por (Lameira *et al.*, 1994) onde, verificaram na regeneração de gemas de *Cephaelis ipecacuanha*, que a concentração de 6,66 μM de BAP induziu uma maior emissão de gemas (5,4 gemas/explante). Porém concordam com os obtidos por Tanuwidjaja *et al.*, (1998), em que altas concentrações de citocininas promovem a formação de grande número de brotações desorganizadas e mal formadas.

Foi observada uma queda na taxa de multiplicação de 8,95 para 6,80 gemas/explante do 1º para o 2º subcultivo para o meio MS suplementado com 1,25 µM de BAP. Resultados opostos foram obtidos por Agrawal e Kothart (1989) trabalhando com *Capisicum annum* em que a taxa de multiplicação de aumentou de 3,1 para 5,6 gemas/explante. Torna-se necessário a realização de outros experimentos para se estabelecer um protocolo mais eficiente.

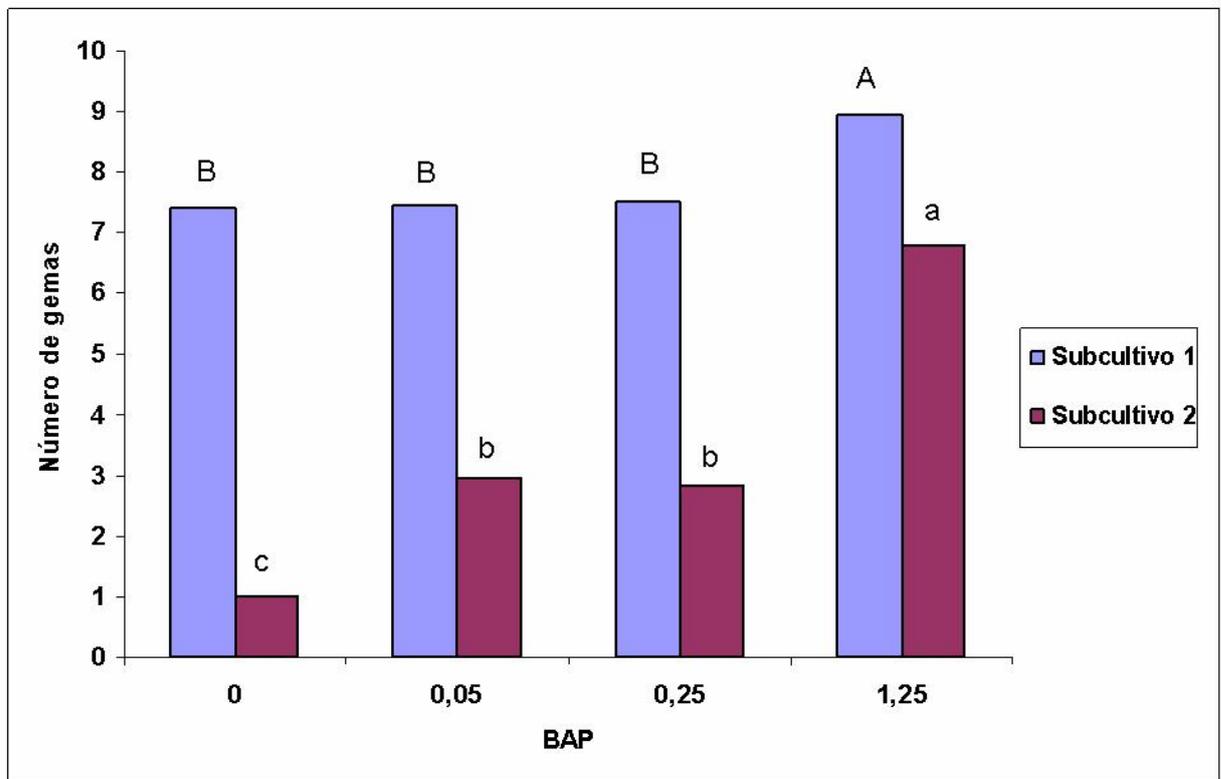


FIGURA 3 — Número médio de gemas (nós + ápices) de *Moringa oleifera* L., emitidos a partir de ápices caulinares com diferentes concentrações de BAP μM em cada subcultivo de 28 dias *in vitro*.

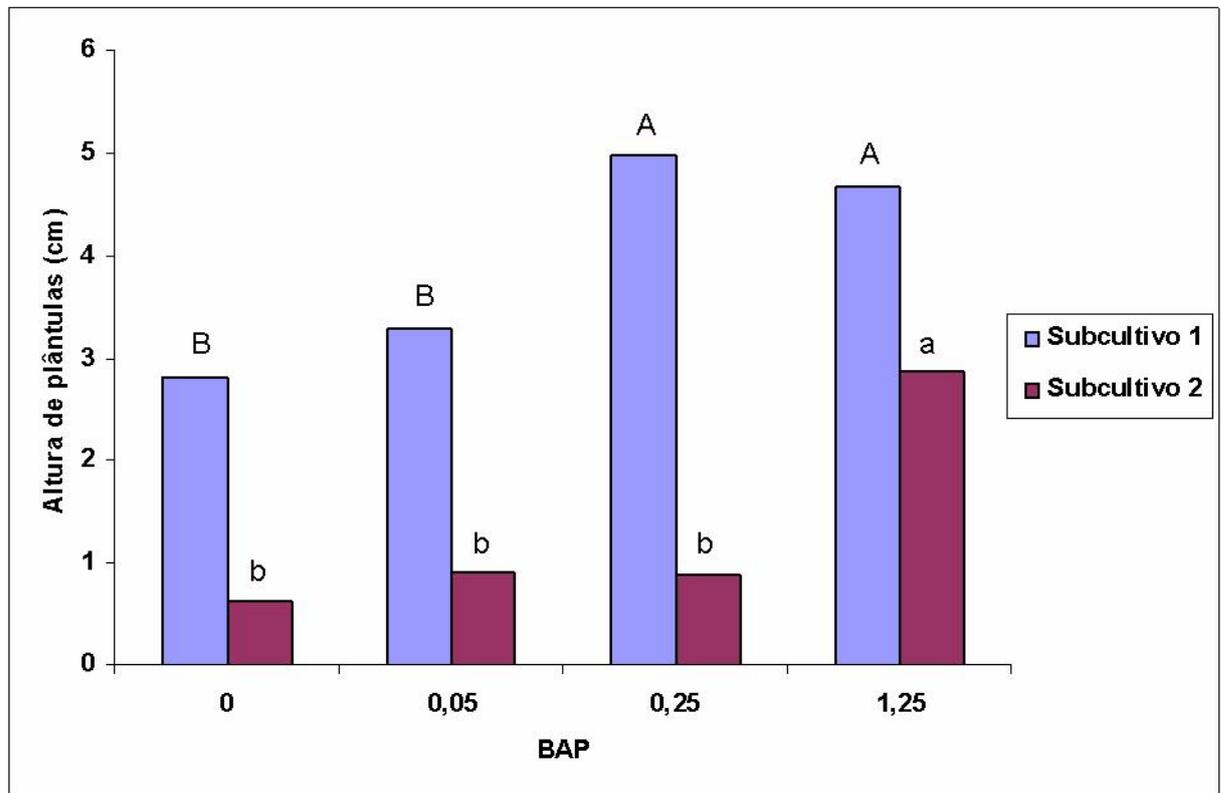


FIGURA 4 – Altura média das plantas de *Moringa oleifera* L., a partir de ápices caulinares com diferentes concentrações de BAP μM em cada subcultivo de 28 dias *in vitro*.

4.1.3 Experimento 3: Influência do BAP e do AIB no estabelecimento de plântulas de *Moringa oleifera* L., a partir de ápices caulinares de plantas germinadas *in vitro*.

Os reguladores de crescimento BAP e AIB interagem no que diz respeito à resposta morfogênica (TABELAS 4, 5 e FIGURAS 5 e 6).

Os resultados da análise de variância mostram que na presença de BAP ($P < 0,01$) houve diferença significativa para o número médio de gemas formadas, mas não para a altura das plântulas. Para o AIB e para a interação BAP x AIB houve diferença significativa ($P < 0,01$) para o número de gemas e para a altura média das plântulas (TABELA 4).

Na FIGURA 5, verifica-se que os ápices caulinares de moringa apresentaram maior número de gemas nos tratamentos com $1,25 \mu\text{M}$ de BAP que foi superior às concentrações mais baixas. Como a interação foi também estatisticamente significativa, o desdobramento dos níveis de AIB dentro da concentração ($1,25 \mu\text{M}$) de BAP mostrou que as concentrações $0,05$ e $0,25 \mu\text{M}$ de AIB foram estatisticamente superiores.

A FIGURA 6, apresenta a altura média das plântulas de moringa. Observa-se que o meio com $0,25 \mu\text{M}$ de AIB na ausência de BAP foi superior aos demais. De acordo com os resultados, pode-se inferir que o meio MS suplementado apenas com AIB na concentração de $0,25 \mu\text{M}$ promoveu o maior alongamento favorecendo assim uma maior distância entre os nós o que favorece o processo de micropropagação. Resultados opostos foram observados segundo Hu e Wang, (1983), em que a combinação BAP x auxinas tem o intuito de minimizar o efeito inibidor que as citocininas têm sobre o alongamento e crescimento das culturas *in vitro*. Para Oliveira e Silveira (2001), em que a combinação BAP com AIB, tem por objetivo estimular o enraizamento do explante inicial e manutenção de um caule único com dominância apical num sistema onde novos segmentos nodais sejam desejados como forma de multiplicação,

Houve formação de brotações laterais no meio com $1,25 \mu\text{M}$ (TABELA 5). A maior porcentagem de enraizamento ocorreu com $0,25 \mu\text{M}$ de AIB na ausência de BAP. Concentrações mais altas de BAP resultaram em redução do enraizamento. A utilização de BAP isolado foi recomendada por (Sripichitt e Nawata, 1987), no nível de 3 mg/L para indução de brotações em cotilédones enquanto que Agrawal e Kothart (1989), o recomenda na concentração de 5 mg/L no meio para indução de brotações também em cotilédone.

De acordo com o presente trabalho o meio MS com 0,25 μM de AIB proporcionou a formação de plântulas mais desenvolvidas e com uma média de 8,7 gemas/explante, podendo assim ser utilizado para a micropropagação da moringa.

TABELA 4 – Resumo da análise de variância para altura média das plantas e para o número médio de gemas emitidas por ápices caulinares de moringa, aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio MS sob diferentes concentrações de BAP e de AIB.

Causas de variação	G.L.	Quadrados médios	
		Altura (cm)	Número de gemas
BAP	3	1,231 ^{NS}	83,552 ^{**}
AIB	3	21,328 ^{**}	34,510 ^{**}
BAP x AIB	9	10,273 ^{**}	10,672 ^{**}
Resíduo	144	0,291	1,278
C.V. (%)		32,3	27,3

** significativo a 1% de probabilidade, NS: não significativo.

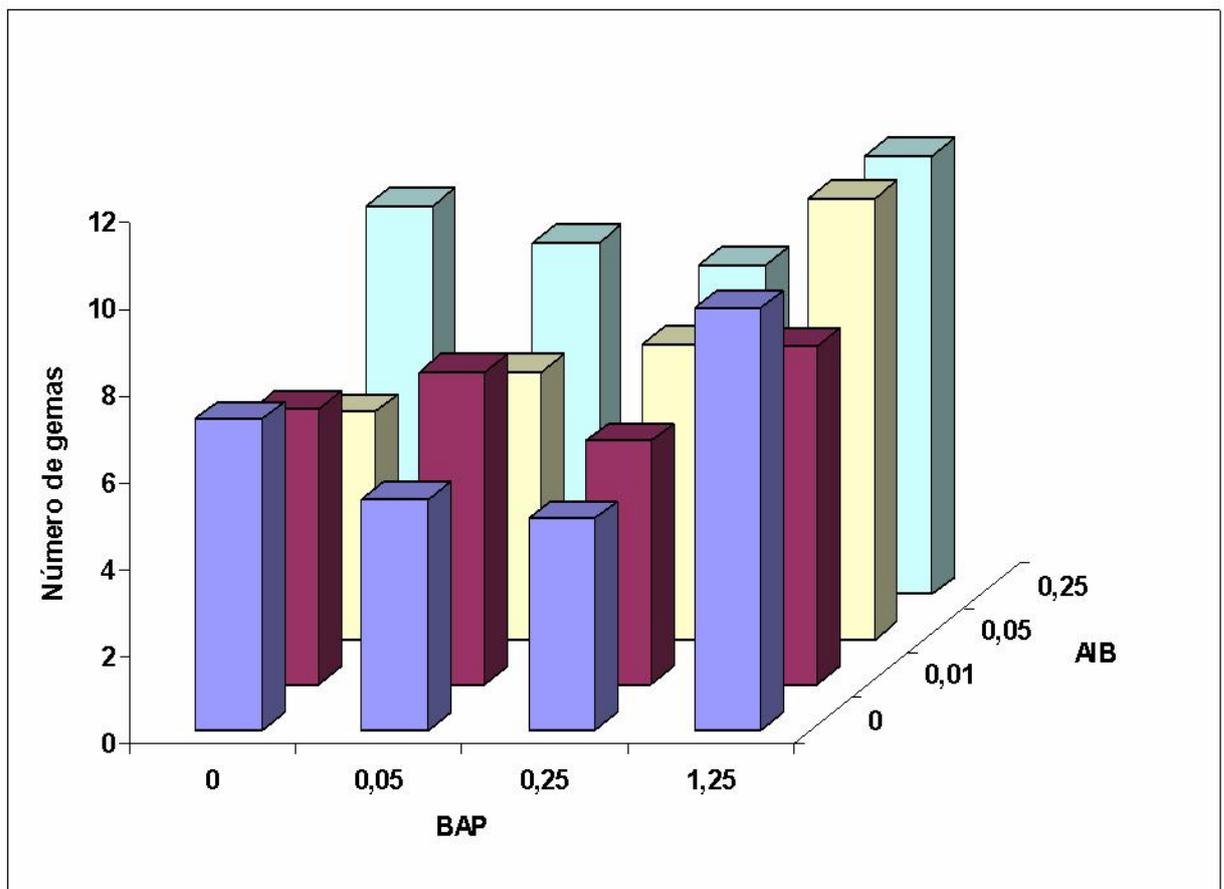


FIGURA 5 — Número médio de gemas (nós + ápice) a partir de ápices caulinares de moringa inoculados sob diferentes combinações dos reguladores de crescimento BAP e AIB (μM).

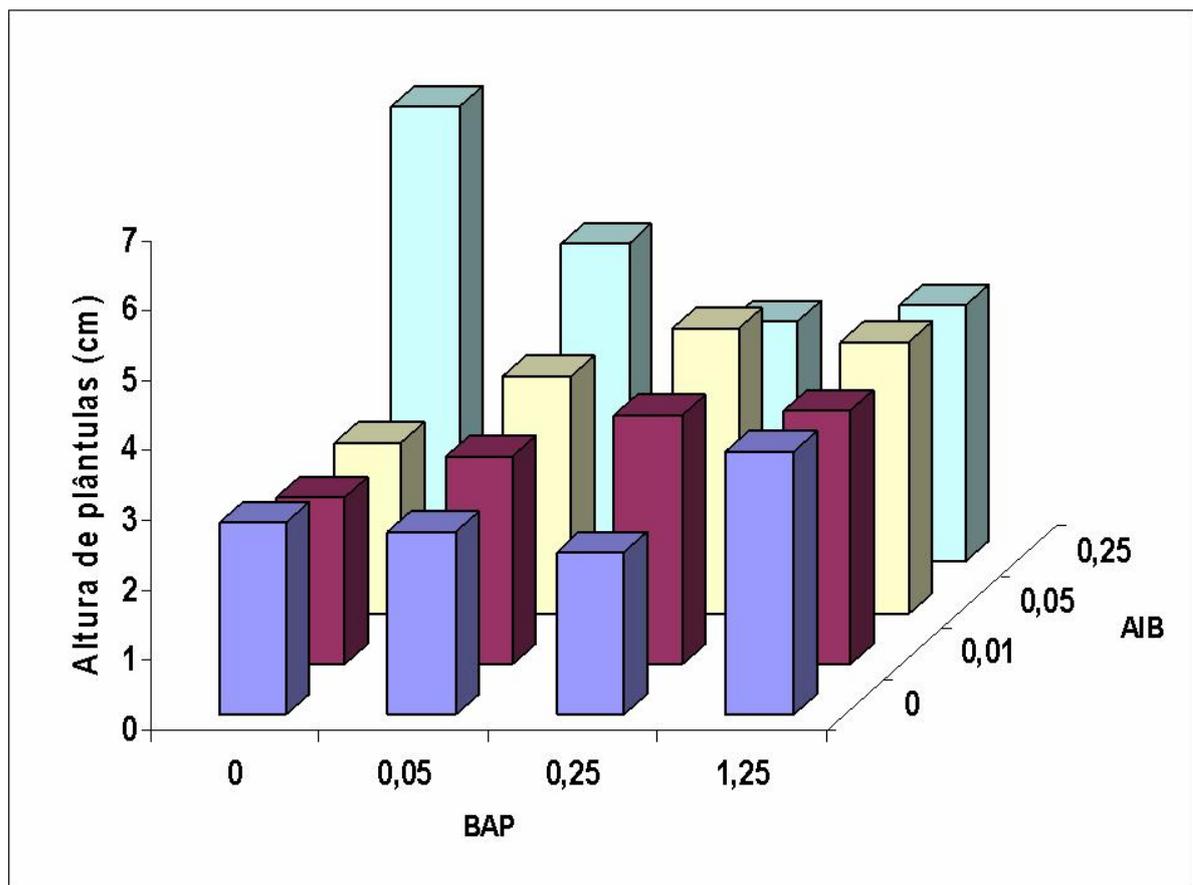


FIGURA 6 — Altura média de plântulas (cm) a partir de ápices caulinares de moringa inoculados sob diferentes combinações dos reguladores de crescimento BAP e AIB (μM).

TABELA 5 – Percentagens de ápices caulinares que emitiam brotações e raízes aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com BAP e AIB.

AIB μM	BAP μM	Meio de cultura	Brotações (%)	Raízes (%)
0,0	0,0	1	0	70
	0,05	2	0	30
	0,25	3	0	0
	1,25	4	100	0
0,01	0,0	5	0	30
	0,05	6	0	40
	0,25	7	0	40
	1,25	8	84	0
0,05	0,0	9	0	20
	0,05	10	0	50
	0,25	11	0	10
	1,25	12	100	0
0,25	0,0	13	0	100
	0,05	14	17	30
	0,25	15	33	0
	1,25	16	100	0

4.1.4 Experimento 4: Subcultivo de gemas (ápices + nós) de *Moringa oleifera* L. em meio MS com diferentes concentrações de BAP e de AIB.

Os diferentes tipos de explantes de *Moringa oleifera* L. induziram diferentes respostas morfogênicas *in vitro* (TABELA 6 e FIGURA 7, 8 e 9). Essas variações foram influenciadas e diferenciadas pelas concentrações de BAP e AIB no meio de cultura.

Os resultados da análise de variância apresentam diferenças significativas para os reguladores BAP e AIB ($P < 0,01$), no número de gemas e na altura de plântulas. O tipo de explante utilizado apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) para a altura e ($P < 0,01$) para o número de gemas. A interação entre BAP x AIB foi significativa ($P < 0,01$) para ambas as variáveis analisadas. As interações entre reguladores e explante não apresentaram diferença significativa para a característica altura de plântulas. Para a variável número de gemas a interação BAP x explante, foi significativa ($P < 0,05$). E a tripla interação com BAP x AIB x explante foi significativa ($P < 0,01$) para o número de gemas, como mostra a (TABELA 6).

Verifica-se na FIGURA 7 que os tratamentos com 1,25 μM de BAP produziram mais gemas, independentemente da concentração de AIB adicionada. Outra característica observada nestes meios, foi à presença de brotações laterais. Os tratamentos com 1,25 μM de BAP apresentaram as maiores taxas de multiplicação, com 100% de seus explantes com brotações laterais. Porém estas eram muito próximas e curtas, o que dificulta o processo de subcultivo das mesmas. O meio com 0,25 μM de AIB apresentou as maiores alturas em relação aos demais tratamentos.

Na FIGURA 8, pode-se observar que o meio com 0,25 μM de AIB (FIGURA 8A) promoveu a maior altura de plântulas com 3,1 cm para as plantas provenientes de ápices caulinares e 4,6 cm para as plantas provenientes de gemas laterais (nó). Este meio promove plântulas mais desenvolvidas. Outra característica apresentada, foi que as plântulas neste tratamento apresentaram raízes como no Experimento 3.

Na FIGURA 9, observa-se que o número de médio de gemas no meio com 0,01 μM de AIB e 1,25 μM de BAP (FIGURA 9D) foi superior apenas para os ápices caulinares 1,8 gemas/explante não acontecendo o mesmo para os nós com 3,5 gemas/explante. O meio com 1,25 μM de BAP apresentou uma boa resposta para ápice 2,6 e para o nó 5,2 gemas/explante. Este mesmo resultado foi obtido no meio com 1,25 μM de BAP e 0,05 de AIB. O meio com 0,25 μM de AIB para o ápice 3,1 e para o nó 4,6 gemas/explante. Levando-se em consideração os meios discutidos acima o meio com 0,25 de AIB promove uma maior

distância entre suas gemas facilitando o processo de micropropagação. Outro fator que pode ser considerado é a uniformidade para ambos os tipos de explantes. Em todos os tratamentos foi observada uma queda na taxa de multiplicação.

A partir dos resultados experimentais, fica evidente que os diferentes tipos e explantes podem induzir respostas diferenciadas quanto à formação de gemas e alturas de plântulas, dependendo da concentração de reguladores de crescimento adicionadas ao meio de cultura. A resposta morfogênética utilizando diferentes explantes, também foi observada em outras espécies como *Proposis tamarugu* (Nandwani e Ramawat, 1992) e *Brassica juncea* (Sharna *et al.*, 1991).

Stephenson e Jed, (2004) trabalhando com o gênero *Moringa ssp* obtiveram de 4,7 a 3,6 gemas/explante utilizando meio MS suplementado com 1 mg/L de BAP e GA₃, o explante utilizado foram embriões imaturos.

A partir do final quarta semana do cultivo *in vitro* as culturas começam a apresentar sinais de senescência o que dificulta estabelecer o processo de micropropagação. A queda na taxa de multiplicação continuou mesmo trabalhando-se com BAP e AIB.

De acordo com os resultados deste trabalho a moringa pode ser micropropagada pelo meio MS com 0,25 µM de AIB e aproximando-se do final da quarta semana de cultivo *in vitro* deve-se fazer o subcultivo ou iniciar uma fase de enraizamento (FIGURA 10).

TABELA 6 — Resumo das análises de variância para ápices caulinares de moringa, para os parâmetros altura de plântulas e número de gemas, quando cultivados em meio MS sob diferentes concentrações de BAP e de AIB.

Causas de variação	G.L.	Quadrados médios	
		Altura (cm)	Número de gemas
BAP	3	17,196**	134,411**
AIB	3	24,037**	53,030**
Explantes	1	2,901*	23,380**
BAP x AIB	9	6,148**	21,598**
BAP x Explante	3	0,285 ^{NS}	5,891*
AIB x Explante	3	2,049 ^{NS}	5,446 ^{NS}
BAP x AIB x Explante	9	1,344 ^{NS}	7,688**
Resíduo	160	0,576	2,060
C.V. (%)		51,2	43,1

NS: não foi significativo, * e **: significativo a 5 e 1%; respectivamente

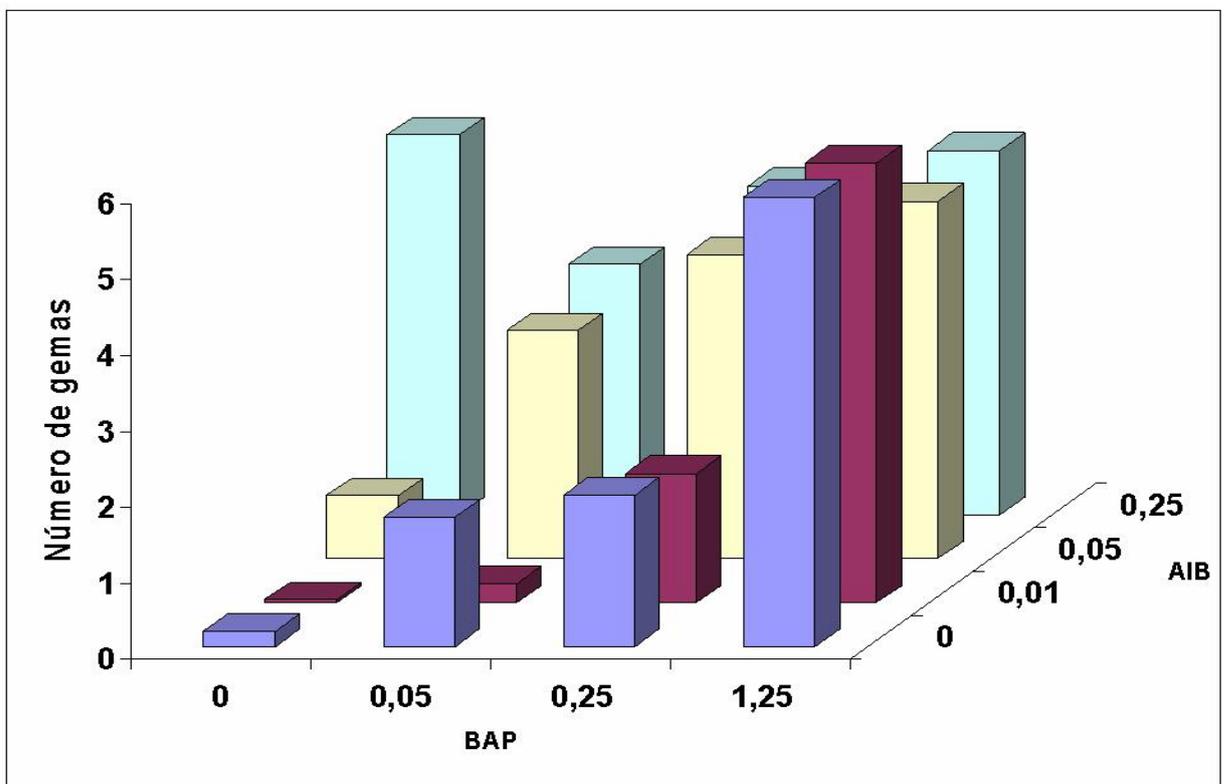
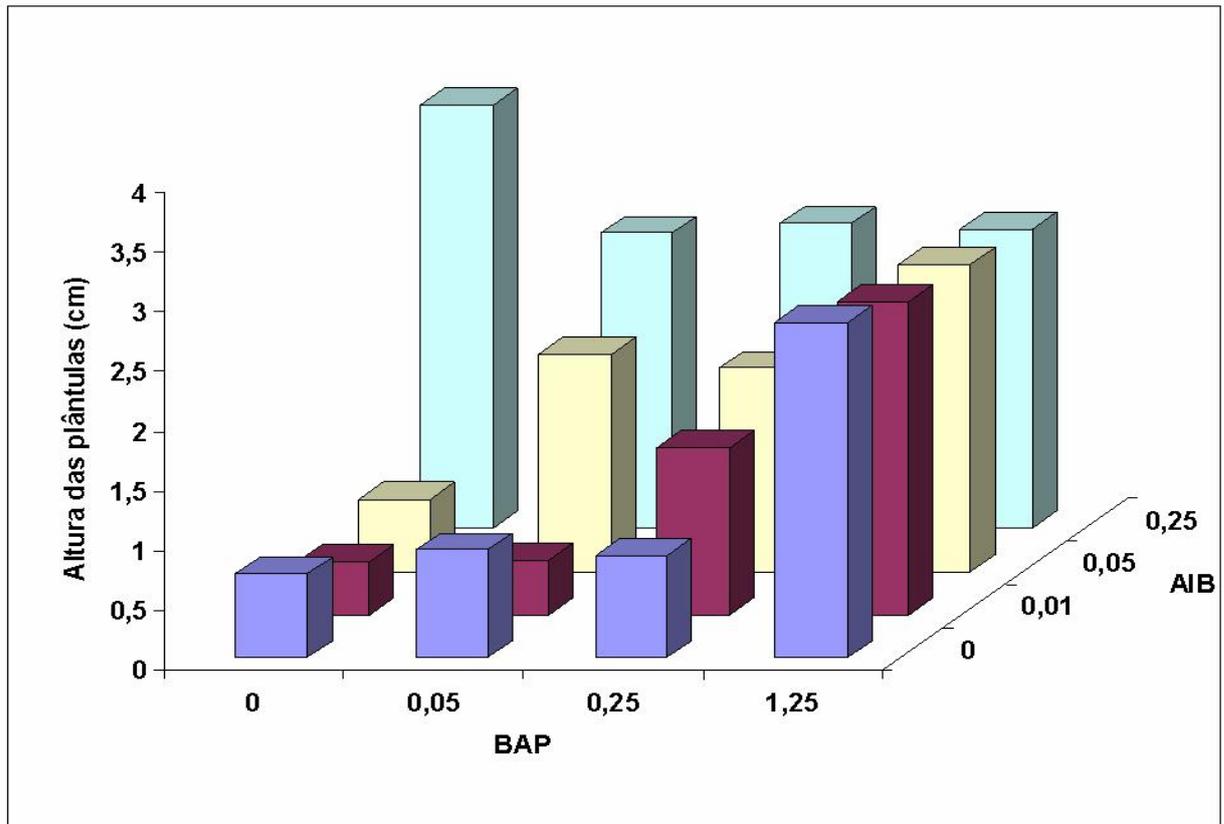


FIGURA 7 — Altura média de plântulas (cm) e número médio de gemas a partir do subcultivo de gemas de moringa inoculadas sob diferentes combinações dos reguladores de crescimento BAP e AIB (μM).

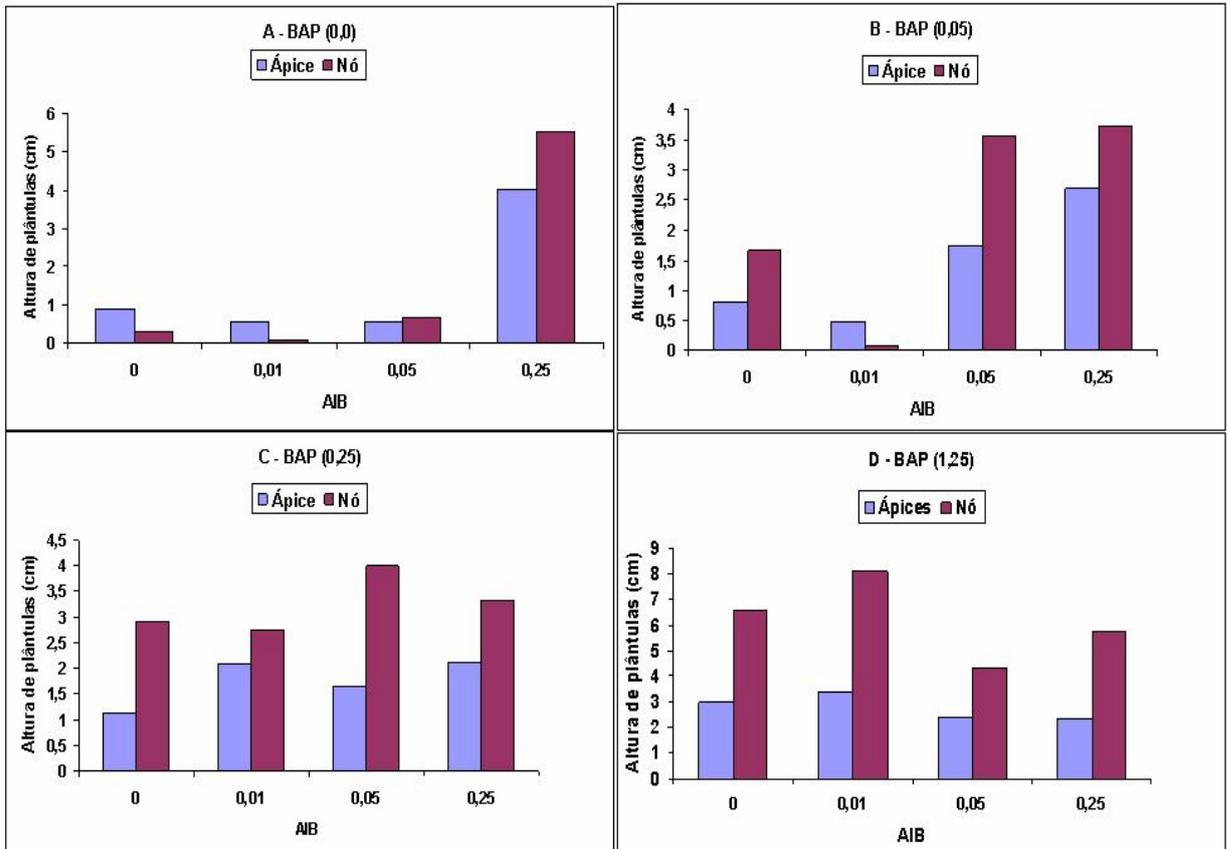


FIGURA 8 — Altura média das plântulas (cm) aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de AIB dentro das concentrações de 0,0 (A), 0,05 (B), 0,25 (C) e 1,25 μM (D) de BAP.

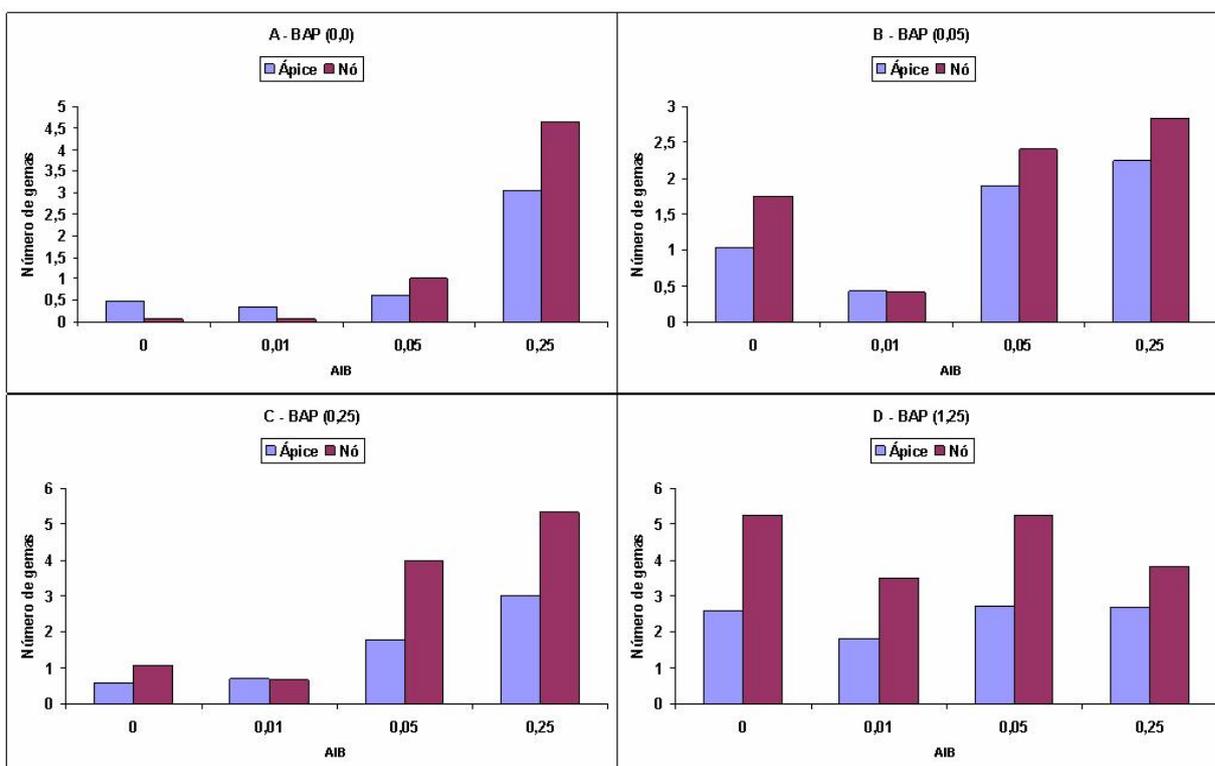


FIGURA 9 — Número médio de gemas aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de AIB dentro das concentrações de 0,0 (A), 0,05 (B), 0,25 (C) e 1,25 μM (D) de BAP.

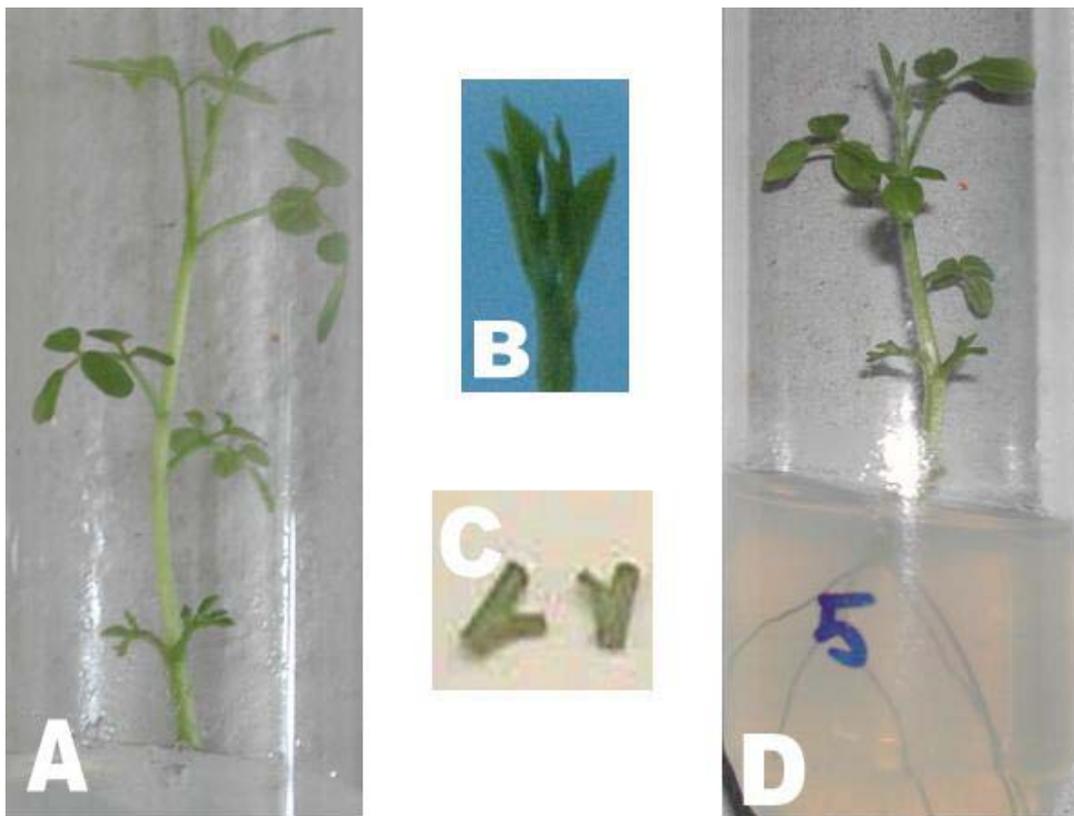


FIGURA 10 — Fonte, tipo e desenvolvimento de explantes na micropropagação de *Moringa oleifera* L. A) plântula de semente germinada em meio MS suplementado com 0,25 μ M de BAP; B) ápice caulinar utilizado como fonte de explante; C) nós utilizados como fonte de explante; D) plântula proveniente do subcultivo em meio MS suplementado com 0,25 μ M de AIB.

4.1.5 Experimento 5: Efeito do Nitrato de Prata (AgNO₃) no controle da senescência de plântulas micropropagadas de *Moringa oleifera* L.

As plântulas de moringa ao final da terceira semana de cultivo *in vitro* iniciavam um processo de senescência, o qual se constituía em um problema para a continuação do processo de micropropagação. Stephenson e Jed (2004), trabalhando em cultura de tecidos de *Moringa* spp. verificaram que o acúmulo de etileno era o fator que causava esta senescência.

Aos 40 dias, verificou-se que o AgNO₃ favoreceu a sobrevivência evitando a senescência das plantas em todos os tratamentos, (TABELA 07). Segundo (Leonhardt, 1987) baixos níveis de AgNO₃ são eficazes contra o etileno evitando a senescência das plântulas. Estes resultados diferem do obtidos por Stephenson e Jed (2004), que utilizavam 5mg/L de AgNO₃ e verificaram que após uma semana as folhas do ápice caulinar apresentavam necrose.

A ausência de AgNO₃ favoreceu o processo de senescência em 40 % dos explantes de moringa.

Pelo presente trabalho a concentração de 3mg/L de AgNO₃ foi suficiente para evitar a senescência das plantas, (FIGURA 11). Outros trabalhos devem ser realizados com o objetivo de determinar a concentração mínima de AgNO₃ para controle da senescência em *Moringa oleifera* L.

TABELA 7 — Percentagem de plântulas em senescência após 40 dias de inoculação em meio MS suplementado com 1,25 μ M de BAP e diferentes concentrações de Nitrato de Prata (AgNO_3), a partir de ápices caulinares de moringa provindos de sementes.

AgNO_3 (mg/L)	Repetições										Senescência (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0,0	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	40 a
3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 b
6,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 b
9,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.; + plântula em senescência; - plântula normal.

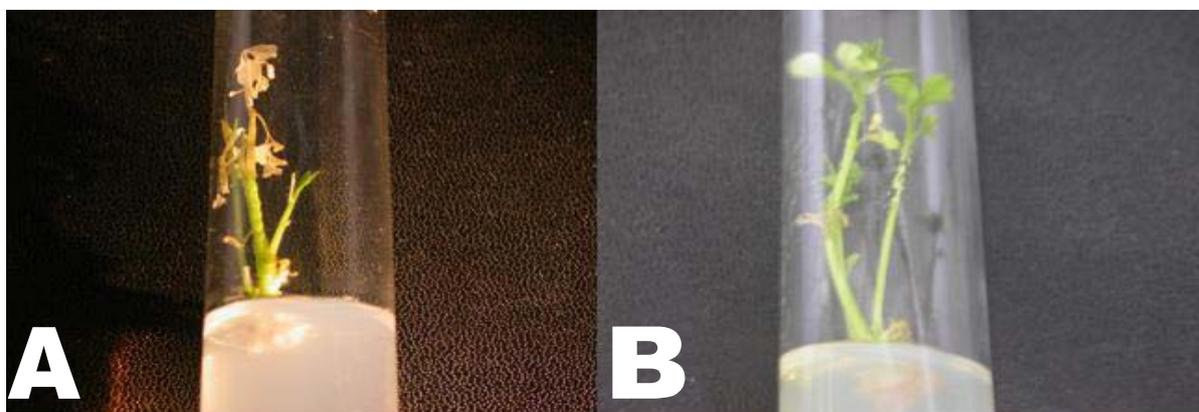


FIGURA 11 — Plântulas de moringa aos 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 1,25 μM de BAP. A) plântula em senescência em meio sem AgNO_3 ; B) plântula inoculada em meio com 3mg/L de AgNO_3 .

4.2 Micropropagação de *Moringa oleifera* L., a partir de ápices caulinares retirados de plantas adultas.

4.2.1 Experimento 1: Desinfestação de explantes provenientes de plantas adultas

Conforme a análise de variância apresentada na TABELA 8, ocorreu efeito significativo entre os tratamentos com as soluções de NaOCl utilizadas neste experimento para a altura das plântulas e percentagem de contaminação.

A partir da concentração de 0,25% de NaOCl não houve contaminação (TABELA 9). O crescimento em altura foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de NaOCl, ou seja, houve redução do crescimento com o aumento da concentração de NaOCl.

Em relação à percentagem de sobrevivência dos explantes, os tratamentos testados não apresentaram diferenças significativas, e a taxa de sobrevivência foi em média, de 81,25 %.

Essa espécie demonstrou ser sensível às concentrações elevadas da solução desinfestante, sendo utilizadas concentrações mais reduzidas de NaOCl do que as utilizadas para espécies lenhosas, como citado para *Miscanthus sinensis* (1,5% de NaOCl por 20 minutos - Nielsen *et al.*, 1993), *Maytenus ilicifolia* (0,25% NaOCl por 30 minutos - Pereira *et al.*, 1995) e *Cercis canadensis* (0,5% de NaOCl 15 minutos – Mackay *et al.*, 1995), entre outras.

Segundo George (1993), para a desinfestação a concentração utilizada dos desinfestantes depende do material vegetal, sendo que, diferentes partes da planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos. Uma desinfestação eficiente elimina os microorganismos e não causa danos ou morte aos tecidos.

No presente trabalho, para a desinfestação, a concentração de 0,25% de NaOCl de foi a que apresentou os melhores resultados, tendo em vista que, na concentração de 0,125 %, foi observada uma maior contaminação e necrose dos ápices caulinares de moringa.

TABELA 8 – Resumo da análise de variância para os parâmetros altura de plântulas, percentagem de sobrevivência e de contaminação, para ápices caulinares de plantas adultas de moringa, quando desinfestadas com diferentes concentrações de solução de NaOCl.

C.V.	G.L.	Quadrados médios		
		Altura (cm)	Sobrevivência (%)	Contaminação (%)
NaOCl	3	0,063*	33,33 ^{NS}	112,50*
Resíduo	4	0,009	75,00	12,500
C.V. (%)		51,38	3,67	50,10

* significativo a 5% de probabilidade, NS – não significativo.

TABELA 9 – Altura média de plântulas e percentagem de contaminação de ápices caulinares de moringa provenientes de plantas adultas aos 7 dias de cultivo *in vitro* após assepsia com diferentes concentrações de NaOCl.

NaOCl (%)	Altura (cm)	Contaminação (%)
0,125	0,83 a	15 b
0,25	0,60 ab	0 a
0,5	0,59 ab	0 a
1	0,39 b	0 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.;

4.2.2 Experimento 2: Efeito dos diferentes tipos de meio de cultura para o desenvolvimento *in vitro* de ápices caulinares obtidos de plantas adultas de *Moringa oleifera* L.

Neste experimento comparou-se o comportamento dos ápices caulinares de moringa em 5 tipos diferentes de meios básicos, MS, MS/2, WPM, SH e B5.

De acordo com os resultados da análise de variância, houve diferença significativa para os meios utilizados ($P < 0,05$) na altura dos explantes. O número de gemas não foi afetado pelos diferentes meios, como mostra a (TABELA 10).

Os ápices caulinares de moringa apresentaram maior crescimento em altura no meio básico B5, (TABELA 11). Embora não tenha apresentado diferença estatística dos meios MS e WPM. Em meio básico SH e MS/2 os explantes apresentaram alto índice de oxidação. Para o meio WPM, observou-se uma altura de 1,35 cm que foi menor do que a do meio B5 com 1,5 cm de altura, embora não tenha apresentado diferença em relação ao número de gemas. A baixa concentração iônica do meio WPM foi benéfica no processo de indução de gemas nos ápices caulinares desta espécie.

Os ápices caulinares de moringa em meio MS e MS/2 apresentaram pouco crescimento, muito provavelmente porque o MS possui altas concentrações de sais. Conforme McCown e Sellmer (1982), a baixa concentração de sais no meio de cultura jamais é prejudicial por não ser o meio de cultura ótimo para o desenvolvimento do explante, como pode ser letal o uso do meio de cultura com altas concentrações de sais.

Os resultados deste trabalho divergem dos obtidos por Cerqueira (1991), que trabalhando com segmentos nodais de sucupira branca em meio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) e em meio básico MS, observou que o meio B5 proporcionou um número maior de folhas por explante (3,3) e maior altura (1,6 cm), como também maior sobrevivência 70 % em relação ao meio MS, em que a sobrevivência, foi de apenas 40 %.

Resultados também diferentes foram obtidos por Quraishi e Mishra (1998) onde obtiveram maior proliferação de gemas em *Cleistanthus collinus* através de segmento nodal proveniente de plantas adultas em meio MS, que foi melhor do que os meios básicos B5 e WPM. Relataram ainda que os maiores comprimentos de gemas foram atingidos com MS suplementado com 0,44 μM de BAP.

Em todos os meios de cultura ocorreu o fenômeno da vitrificação, o qual provocava formação atípica de moringa, com entrenós curtos e com folhas curvadas, espessas,

quebradiças e de tamanho reduzido. Segundo Ziv (1991), estes sintomas são provocados por desordens fisiológicas, denominadas de vitrificação, que ocorrem, frequentemente, na cultura *in vitro* de muitas espécies, e são atribuídas, principalmente, a idade do material utilizado como explante.

Neste trabalho, os melhores resultados para o estabelecimento das brotações ocorreram quando se utilizou o meio básico WPM, o qual apresentou brotações menos vitrificadas que o meio B5.

TABELA 10 – Resumo da análise de variância para os parâmetros altura de plântulas e número de gemas em ápices caulinares de plantas adultas de moringa aos 28 dias de cultivo *in vitro* em diferentes tipos de meio.

C.V.	G.L.	Quadrados médios	
		Altura (cm)	Número de Gemas
Sais	4	0,801*	0,200 ^{NS}
Resíduo	45	0,175	0,137
C.V. (%)		54,86	46,85

* significativo a 5% de probabilidade, NS – não significativo.

TABELA 11 – Altura média de plântulas e percentagem de contaminação de ápices caulinares de moringa provenientes de plantas adultas aos 7 dias após assepsia com diferentes concentrações de NaOCl.

Meios de Cultura	Altura (cm)	Número de gemas
MS	1,27 ab	1,40 a
MS/2	0,88 b	1,15 a
WPM	1,35 ab	1,45 a
SH	0,88 b	1,15 a
B5	1,50 a	1,35 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4.2.3 Experimento 3: Efeito do BAP no estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares obtidos de plantas adultas de *Moringa oleifera* L.

Os resultados da análise de variância mostraram diferenças significativas entre os níveis de BAP utilizados ($P < 0,05$) para número médio de gemas e comprimento das plântulas (TABELA 12). Com o aumento da concentração de BAP, houve um aumento no comprimento médio das plantas até a concentração de $1,25 \mu\text{M}$, embora não tenha havido diferença significativa entre estes tratamentos. Após 21 dias de cultivo, o desenvolvimento de gemas axilares, formando brotações, e o comprimento destas foram pouco influenciadas pela presença do BAP. O valor de $0,25 \mu\text{M}$ de BAP promoveu o melhor desenvolvimento tanto para o número de gemas como para altura da plântula.

Na fase inicial de cultura, o BAP não favoreceu a emissão de brotações nem o comprimento destas. Deschamps (1993) observou que as brotações de sarandi apresentaram um maior desenvolvimento em meio WPM sem reguladores de crescimento, e que a adição de BAP foi responsável pela redução do número de folhas por explante e também pela redução do comprimento das brotações. Embora o BAP seja utilizado na maioria dos sistemas experimentais *in vitro*, verifica-se que as culturas apresentam diferentes sensibilidades a essa citocinina dependendo do meio de cultura utilizado e da fase de cultivo.

Os explantes inoculados no meio com $6,25 \mu\text{M}$ de BAP, aos 21 dias apresentaram a formação de um calo com brotações. Estas brotações foram subcultivadas no mesmo meio de cultura para trabalhos posteriores (FIGURA 12). Estes resultados diferem dos obtidos por Bonga, (1987) e Hackett, (1987) que trabalhando com *Eucalyptus* mostraram que ao se isolar segmentos nodais de ramos adultos da árvore, ocorre inicialmente formação de calo sobre todo o explante, seguida de sua necrose e morte sem haver qualquer indicio de brotação da gema axilar.

De acordo com os resultados deste trabalho a concentração de $6,25 \mu\text{M}$ apresentou um resultado satisfatório promovendo o aparecimento de brotações. Estas devem ser subcultivadas em meio WPM suplementado com $0,25 \mu\text{M}$ de BAP.

TABELA 12 — Valores médios do número e comprimento (cm) de brotos de moringa em função de diferentes concentrações de BAP aos 21 dias de cultivo *in vitro*.

BAP (μM)	Nº médio de gemas (ápices e nós)	Comprimento médio das plântulas (cm)
0,0	$1,00 \pm 0,00$ b	$1,25 \pm 0,42$ ab
0,05	$1,33 \pm 0,52$ ab	$1,32 \pm 0,55$ ab
0,25	$1,50 \pm 0,84$ a	$1,61 \pm 0,93$ a
1,25	$1,17 \pm 1,17$ ab	$1,67 \pm 0,61$ a
6,25	$1,00 \pm 0,00$ b*	$0,5 \pm 0,00$ b*

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.; \pm desvio padrão.; * formação de calos e aparecimento de partes aéreas.

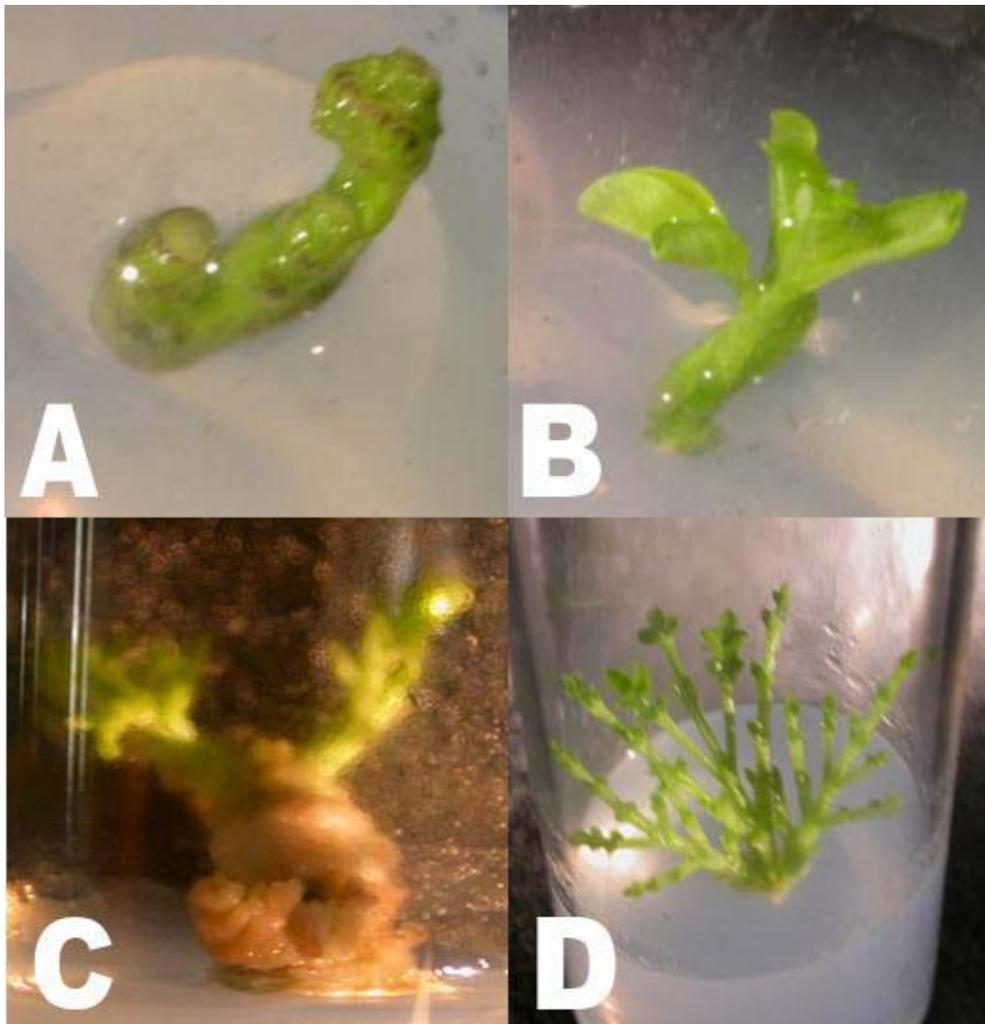


FIGURA 12 — Micropropagação de ápices caulinares retirados de plantas adultas de *Moringa oleifera* L. A) ápice desinfestado; B) ápice caulinar aos 14 dias de cultivo em meio WPM com 0,25 μM de BAP; C) formação de calos em meio WPM com 6,25 μM de BAP; D) parte aérea subcultivada em meio WPM com 0,25 μM de BAP após 14 dias de inoculação.

5 CONCLUSÕES

Nas condições em que foram desenvolvidos estes trabalhos pode-se chegar às conclusões de que a micropropagação da *Moringa oleifera* L. pode ser feita da seguinte forma.

Para se propagar por meio de sementes, recomenda-se utilizar, para a desinfestação, álcool etílico, 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 0,25% por 10 minutos e três lavagens com água estéril para se obter uma maior percentagem de germinação e altura das plântulas. Passada uma semana da data de inoculação, estes ápices podem ser excisados e inoculados em meio MS com 0,25 μ M de AIB. Este meio proporcionará o desenvolvimento de plântulas com 6,4 cm de altura e uma taxa de multiplicação de 8,9 gemas para cada ápice caulinar. Após 28 dias, um novo subcultivo deve ser realizado no mesmo meio, e levando-se em consideração tanto ápices quanto nós, a resposta média proporcionará a formação de plântulas com 3,5 cm de altura e uma taxa de multiplicação de 5,1 gemas/explante.

O uso de nitrato de prata a 3mg/L, pode aumentar o tempo de plântulas de moringa *in vitro* sem apresentar sinais de senescência. Outros protocolos precisam ser estabelecidos para o enraizamento e aclimatização destas plântulas.

Para se propagar a partir de ápices de plantas adultas, recomenda-se utilizar, para a desinfestação, o mesmo procedimento usado para as sementes. Estes devem ser inoculados em meio WPM suplementado com 6,25 μ M de BAP e após 21 dias, promoverão brotações, que subcultivadas em meio WPM suplementado com 0,25 μ M de BAP, originarão plântulas únicas, porem vitrificadas.

Estudos precisam ser realizados a fim de melhorar o protocolo a partir de plantas adultas de moringa. As plântulas conseguidas aqui se mostram vitrificadas e precisam ser subcultivadas a cada 3 semanas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, S.; KOTHART, S.L. Plant regeneration in tissue culture of pepper (*Capsicum annum* L. cv. Mathania). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.16, p.47-55, 1989.

ANWAR, F., BHANGER, M. I. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 6558-6563, 2003.

BEZERRA, A. M. E.; MOMENTÉ, V. G., MEDEIROS FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* L.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n.2, p. 295-299, 2004.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2 ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BERTOLUCCI, S.K.V. **Micropropagação, calogênese e abordagem fotoquímica *in vitro* de *Tournefortia cv paniculata* Cham.** Lavras, MG: UFLA, 1999. 79p. (Dissertação - Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica).

BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. **Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. 422p.

BORGES, E.E. de L.; RENA, A.B. **Germinação de sementes**. In: AGUIAR I.B. de PINA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES/Comitê Técnico de Sementes Florestais, 1993,c.3, p.83-135.

CÁCERES, A.; CABRERA, O.; MORALES, O.; MOLLINEDO, P.; MENDIA, P. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, p. 213-216, 1991.

CÁCERES, A.; FREIRE, V.; GIRÓN, L. M.; AVILÉS, O.; PACHECO, G. *Moringa oleifera* L. (Moringaceae): ethnobotanical studies in Guatemala. **Economic Botany**, Bronx, v. 45, n. 4, p. 522-523, 1992.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos de plantas e transformação genética de plantas**. EMBRAPA-CBAB, 1998. v.1, p.97-132.

CARVALHO, N.M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. 3 ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 429 p.

CERQUEIRA, C.R.C. Micropropagação de sucupira branca, *Pterodon pubescens*. In: **ENCONTRO DE BOTÂNICOS DO CENTRO-OESTE**, 1., 1991, Brasília. Resumos. Planaltina: EMBRAPA-CPAC/unb. 1991, p.48.

CHATUVERDI, H.C.; MISRA, P.; SHARMA, M. In vitro multiplication of *Rosmarinus officinalis* L. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie Bd.**, Stuttgart, v. 113, p. 301-304, 1984.

CHEEMA, G.S.; SHARMA, D.P. In vitro propagation of apple rootstocks-EMLA. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.131, p.75-88, 1983.

COSTA, M.P. **Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard) obtidas in vitro submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação**. 1995. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DAVEY, M.R.; KUMAR, V.; HAMMATT, N. In vitro culture of legumes. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (eds). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwe Academic Publishers. 1994. Cap. 13, p.313-329.

DAHOT, M.U. Vitamin contents of the flowers and seeds of *Moringa oleifera* L. **Journal of Biochemistry**, v.21, n.1-2, p.21-24, 1998.

DESCHAMPS, C. **Propagação vegetativa in vitro de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.), espécie florestal de mata ciliar**. Lavras: ESAL, 1993. 128p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1993.

DIXON, R.A. Isolation and maintenance of callus and cell suspension culture. In: DIXON, R.A. (Ed). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p.1-20.

DUNSTAN, D.I.; THORPE, T.A. Regeneration in forest trees. In: VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Plants Regeneration and genetic variability. Florida: Academic Press, Incorporation. 1986. v.3, cap. 11, p.223-241.

EILERT, U. WOLTERS, B. NAHRSTEDT, A. The antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*. **Journal Medicinal Plant Reserch**. v.42, p.55-61, 1981.

EVENARI, M.J.; CÍCERO, M.S.; SILVA, W.R. da. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 320 p.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Rev. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2003. p. 105-124.

FREIBERGER C.E.; VANDERJAGT, D.J.; PASTUSZYN A.; GLEW R.S.; MOUNKAILA, G.; MILLSON M.; GLEW R.H. 1998. Nutrient content of the edible leaves of seven wild plants from Niger. **Plant Foods Human Nutr** 53:57-69.

FOLKARD, G.K.; SUTHERLAND, J.P.; GRANT, W.D. Natural coagulants at pilot scale; In: Pickford, J., ed. *Water, Environment and Management: Proc. of the 18th WEDC Conference*, Kathmandu, Nepal, 30 Aug.-3 Sept. 1992. **Loughborough University Press**, p51-54, 1993.

FUGLIE, L. J. 1999. **The miracle tree: Moringa oleifera**. Natural nutrition for the tropics. Church World Service, Dakar.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158. 1968.

GASSENSCHMIDT, U., JANY, K. D., TAUSCHER, B., NIEBERGALL, H. Isolation e characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochemical et Biophysical Acta**, v. 1243, p. 477-481, 1995.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Great Britain: Exegetics Limited, v.1, 1993, 375 p.

GEORGE, E. **Plant propagation by tissue culture**, part 1 – the technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GOMES, A.L. **Propagação clonal: princípios e particularidades**. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1987. 69p.

GOMES, G.A.C. **Propagação in vitro de Moreira (Maclura tinctoria)**. 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1998. p.99-170.

HACKETT, W.P.; MURRAY, J.R. Maturation and rejuvenation in woody species. In: AHUJA, M.R. (Eds). **Micropropagation in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993.

HACKETT, W.P. Juvenility and maturity. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J., ed. **Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p.216-231.

HARRY, I.S.; THORPE, T.A. In vitro culture of forest trees. In: VASIL, J.K.; THORPE, T.A. (eds). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht, 1994. Cap.21, p.539-560.

HENSHAW, G.G.; O HARA, J.F., WEBB, K.J. Morphogenetic studies in plant tissue cultures. **Symposi Britanic Society Biological.**, v.4, p.231-51, 1982.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. e YAMADA, Y., (eds). **Handbook of plant cell culture**. Techniques for propagation and breeding, New York, McMillan Publishing Company, 1983. v.1, p.117-227.

JAHN S.A.A.; MUSNAD H.A.; BURGSTALLER H. **The tree that purifies water: Cultivating multipurpose Moringaceae in the Sudan**. Unasylva v.38, p.23-28, 1986.

KOUZAI, T.A. **Acclimatization of micropropagated plants. Biotechnology on Agriculture and Forestry**. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed) **High-Tech and micropropagation**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. v.17, p.127-141.

KUMAR, V.; RADHA, A.; CHITTA, S. *In vitro* plant regeneration of fig (*Ficus carica* L. cv. Gular) using apical buds from mature trees. **Plant Cell Reports**, New York, v.17, p.717-720, 1998.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Whashington: OEA, 1983. 174p.

LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P.; PINTO, J.E.B.P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures *in vitro*. **Ciência Rural**, v.24, n.3, p.523-526, jun. 1994.

LAROUSSE, **Grande Enciclopédia Delta**. Nova Cultural, 1998. vol. 11, p.2701.

LEONHARDT, W. Ethylene accumulation in culture vessels-a reason for vitrification? **Acta Horticulture**. v.212, p.223-229,1987.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceeding International Plant Propagators Society**. v.30, p.421-427, 1980.

LOPES, S.C.; LAMEIRA, O.A.; FORTES, G.R.L; NOGUEIRA, R.C.; PINTO, J.E.B.P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, Lavras, v.7., n.1 p.124-128, 2001.

LORENZI, H., MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 346-347, 2002.

MACKAY, W. A.; TIPTON, J. L.; THOMPSON, G.A. Micropropagation of Mexican redbud, *Cercis canadensis* var. *mexicana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**., Dordrecht, v. 43, p. 295-299, 1995.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYER, A. **The germination of seeds**. New York: Pergamon Press, 1989. 210 p.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas comunidades. 3. ed. Fortaleza: EUFC, 1998. 220 p.

McCOWN, B.H.; SELLMER, J.C. General media and vessel suitable for woody plant culture. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. **Cell and tissue culture in Forestry**. Dordrecht, 1982. v.1, cap.2, p.5-16.

McGRANAHAN, G. H.; DRIVER, J. A.; TULECKE, W. Tissue culture of Juglans. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (eds.). **Cell and tissue culture in forestry**: Case histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987, v.3, p. 261-271.

MELO, J.T. de; SILVA, J.A. da; TORRES, R.A. de A.; SILVEIRA, C.E. dos S. da; CALDAS, L.S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. de. (eds). Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 1998. 5556p. Cap. V. p.195-231.

MELO, N.F.de; OKASAKI, W.Y.; LEITE, C.B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência. e Agrotecnologia.**, Lavras, v.23, n.1, p-102-107, jan./mar;. 1999.

MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Ed.). **Cultivo de tejidos em la agricultura** – fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, p.19-40, 1993.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.6, p.473-479, June 1962.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Plant propagation throught tissue cultures. **Annual Review of Plant physiology**, Palo Alto, v.25, p.153-166, 1974.

NANDWANI, D.; RAMAWAT, K.G. High frequency plantets regeneration from seedlings explants of *Proposis tamarugo*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 29:173-8, 1992.

NIELSEN, J. M.; BRANDT, K.; HANSEN, J. Long-term effects of thidiazuron are intermediate between benzyladenine, kinetin or isopentenyladenine in *Miscanthus sinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Dordrecht, v. 35, p. 173-179, 1993.

OKUDA, T.; BAES, A.U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. **Water Research**, v.35, n.2, p. 405-410, 2001.

OLIVEIRA, R.P. de; SILVEIRA, D.G.; SILVA, S. de O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (Grupo AAAB). **Scientia Agricola**, v.58, p.73-78, 2001.

PAIVA NETO, V. B. de. **Comportamento *in vitro* de tecido foliar e seguimento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)**. Lavras/MG: UFLA, 1996, 39p. (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal).

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações** – introdução: fundamentos básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159p.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: Meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PEREIRA, A. M. S.; MORO, J. R.; CERDEIRA, R. M. M.; FRANÇA, S. C. Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.42, p. 295-297, 1995.

PEREIRA, C. D.; MELO, B. **Cultura de tecidos vegetais**. Uberlândia: UFU/ICIAG, 2004. Disponível em: <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/cult_tecidos.htm>. Acesso em: 12/jul/2005.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Martins Nijoff publishers, 1990. 326 p.

PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E.F.; PINTO, C.A.B.P.; BARBOSA, M.H.P. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, p.867-873, 1994.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. 2. ed. Brasília, DF:AGIPLAN, 1985. 289 p.

QURAIISHI, A.; MISHRA, S.K. Micropropagation of nodal explants from adult trees of *Cleistanthus collinus*. **Plant Cell Reports**, New York, v.17, p.430-433, 1998.

RAGHAVA SWAMY, B. V.; HIMABINDU, K.; LAKSHMI SITA, G. In vitro micropropagation of elite rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, p. 126-131, 1992.

RAMACHANDRAN, D.; PETER, K.V.; GOPALAKRISHNAN, P.K. Drumstick (*Moringa oleifera*): A multipurpose Indian vegetable. **Economic Botany**, v. 34, p. 276-283, 1980.

RAO, A.N.; LEE, S.K. One overview of the *in vitro* propagation of woody plants and plantation crops. In: WHITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. **Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications**. Nottingham: Butterworths, 1986. Cap.12, p.123-138.

SANTIAGO, E.J.A. **Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimento longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**. 2003. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, M.R.A. dos. Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach. UFLA, Lavras/MG. 1998, 81p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia).

SANTOS, A.P. Avaliação silvicultural de clones de *Eucalyptus* spp. propagados por macro e micropropagação. 2003. 51p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.

SAS. 1992-1998. Institute Inc. **SAS Language reference**. Version 6, Cary NC: SAS Institute Inc. 1042p.

SHARNA, K.K.; BHOJWANI, S.S.; THORPE, T.A. The role of cotyledonary tissue in the differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L) Czern. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.24, p.55-9, 1991.

SILVA, A. R.; KERR, E. W. **Moringa uma nova alternativa para o Brasil**. Fortaleza: UFC DIRIU, 1999. 95 p.

SILVA, E.M.P. de; SOUZA, V.A.B. de; SILVA, K.J.D. e; ANDRADE, F.N. Efeito de diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio e bicloreto de mercúrio na desinfestação de explantes caulinares de umbu-cajazeira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém, PA. **Anais ...** Belém: Sociedade Brasileira de Fruticultura: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. CD-ROM.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.

SOUZA, V.A.B. de; SOUZA, C.L.C. de; OLIVEIRA, D.B. de. Efeito de diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio e bicloreto de mercúrio na desinfestação de explantes de cajazeira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16., 2000, Fortaleza, CE. **Anais ...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Fruticultura: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. CD-ROM.

SPJUT, R.W. Limitations of a random screen: search for new antiancancer drugs in higher plants. **Economic Botany**, Bronx, v.39, n.3, p. 266-288, 1985.

SRIPICHITT, P.; NAWATA, E. In vitro shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper (*Capsicum annum* L. cv. Yatsufusa). **Japanese Journal Breeding**, v.37, p.133-42, 1987.

STEPHENSON, K.K.; JED W.F. Development of tissue culture methods for the rescue and propagation of endangered *Moringa* spp. Germplasm. **Economic Botany**, The New York Botanical Garden Press, Bronx, v.58, p.117-124, 2004.

TANUWIDJAJA, C.; WEBB, D.T.; SAGAWA, Y. Micropropagation of *Akia* (*Wikstroemia uva-ursi* A. Gray). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.53, p.85-90, 1998.

TEIXEIRA, J.B.; LEMOS, J.I.; COELHO, M.C.F. Micropropagação de espécies lenhosas da Mata Atlântica. In: **Resumo do V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**. Lavras, 1995. p.132.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis on plant regeneration. In: DIXON, R.A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p.79-105.

TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. Micropropagação de plantas ornamentais. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo**, Campinas, SP, n.174, p.58-62, maio 1998.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1, p. 184-185.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 433p., 1990.

VERDCOURT, B. A synopsis of the Moringaceae. **Kew Bulletin** v.40, p.1-23, 1985.

VILLALOBOS, V. M.; THORPE, T. A. Micropropagación: concepto, metodología y resultados. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. cap.6, p.127-142.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 49-69.